

2015

Instituto Politécnico de Coimbra

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE COIMBRA

Extração de agar de algas vermelhas do género *Gracilaria*

MESTRADO EM PROCESSOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

AUTOR | Diana Mafalda Oliveira Ferreira

ORIENTADOR | Prof. Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro
| Prof. Doutora Maria Nazaré Coelho Pinheiro
| Prof. Doutora Maria Manuel Balseiro Vidal

Coimbra, maio 2015

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra



Departamento de Engenharia Química e Biológica

Extração de ágar de algas vermelhas do género *Gracilaria*

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Processos Químicos e Biológicos

(Edição 2012-2014)

Diana Mafalda Oliveira Ferreira

Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro (DEQB-ISEC)

Doutora Maria Nazaré Coelho Pinheiro (DEQB-ISEC)

Doutora Maria Manuel Balseiro Vidal (ESAC)

Coimbra, maio, 2015

"When it comes to making the decision to change your lifestyle and start acting green, most people are hesitant to take that first step towards going the road less traveled. Many think that it will be more of a chore than a self-fulfilling act, or even worse, that only one person can't possibly make a difference. It's thoughts like these that stop the progression towards improving our environment, and ultimately threatens our future as residents here on Earth. If we don't stop this selfish train of thought and start acting green, then it is certain that we will permanently tarnish the only planet we have to call home."

Ecoendure, Empresa Norte-americana produtora de filmes biodegradáveis)

AGRADECIMENTOS

No início desta etapa, e sabendo que a mesma decorreu ainda durante, sensivelmente, dois anos, muitos foram os acontecimentos e as pessoas que permitiram que a mesma chegasse, finalmente, ao fim. Deste modo, chega então a altura de prestar alguns agradecimentos a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, permitiram que a mesma chegasse a este patamar. Esta é então, a maneira de agradecer formalmente a todos. Assim, quero desde já agradecer aos meus orientadores, Doutor Luís Miguel Moura Neves de Castro, Doutora Maria Nazaré Coelho Pinheiro e Doutora Maria Manuel Balseiro Vidal, não só porque me orientaram e se prontificaram, desde sempre, a dar sugestões que permitissem uma melhoria contínua de todo o trabalho apresentado, mas também pela atenção dispensada, pelo apoio fornecido e acima de tudo pela ajuda que me deram na elaboração deste projeto.

Aos meus amigos desta instituição e nomeadamente aos meus colegas de laboratório que, fizeram com que as adversidades e transtornos encontrados conseguissem ser ultrapassados.

Aos meus amigos, nomeadamente, à Helena Correia, ao Pedro Alves, à Joana Freitas e a todos aqueles que conseguiram dar-me orientação no meu dia-a-dia para não me esquecesse de respirar e acalmar nos momentos certos.

Uma palavra especial com muito carinho ao Miguel Barbosa, não só por conseguir encontrar sempre as palavras certas, como também por me ter ajudado aquando da execução de alguns procedimentos deste projeto e por me ter apoiado, compreendido e feito acreditar que o inalcançável, realmente, não existe...

Por último mas não menos importante, quero agradecer imenso aos meus pais, aos meus irmãos, à minha madrinha, avô e avó. Cada um deles, com o seu jeito peculiar, me fez crescer não só ao nível das minhas competências pessoais, mas também a um nível humano uma vez que toda eu contenho uns alicerces bem definidos em vós.

A todos, Muitíssimo Obrigada!

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se avaliar o potencial das algas da espécie *Gracilaria vermiculophylla* recolhidas, nos anos 2013-14, numa piscicultura instalada na Ria de Aveiro (40° 38' 00" N; 84° 44' 00" W) como matéria-prima para a produção de ágar.

De acordo com a literatura, as algas do género *Gracilaria* requerem um tratamento prévio à etapa de extração. Embora haja referência a diferentes tipos de pré-tratamento, neste trabalho apenas foi avaliado o pré-tratamento das algas à temperatura ambiente em meio alcalino utilizando hidróxido de sódio como base.

O ágar, também conhecido como ágar-ágar ou agarose, é um biopolímero que pode ser extraído de várias espécies de algas vermelhas pertencentes à classe *Rhodophyta*, estando presente na parede celular das mesmas. Possui características bastante distintas face a outros biopolímeros e o seu teor nas algas vermelhas varia consoante o habitat onde se encontram. Esta espécie de algas desenvolve-se não só em zonas “selvagens” como também pode desenvolver-se nos tanques utilizados na produção piscícola em aquicultura, o que constitui um problema no período da pesca, havendo a necessidade da sua remoção periódica. Estas algas removidas constituem assim, um resíduo para esta atividade industrial. Com vista a contornar este problema ambiental, fez-se um estudo com a finalidade de valorizar este resíduo através da extração do ágar, produto este com bastante valor comercial. O ágar é caracterizado por ser insolúvel em água fria e por absorver grandes quantidades de água a temperaturas elevadas, formando um gel após o seu arrefecimento. Este gel, é um produto bastante utilizado para aplicações na indústria alimentar, sendo as algas do género *Gracilaria* a principal fonte de ágar para este sector industrial.

Na presente dissertação, foram utilizadas algas da espécie *Gracilaria vermiculophylla* colhidas na ria de Aveiro para a extração de ágar. Confirmou-se que após um pré-tratamento adequado estas produziam ágar de qualidade para ser utilizado na indústria alimentar. Deste modo, foi otimizado o processo de extração do ágar das algas com o objetivo de aumentar o rendimento do processo e a qualidade do produto final em termos de algumas das suas propriedades mais importantes. Para isso, antes de se proceder à extração do ágar, foram alterados individualmente diversos parâmetros do pré-tratamento em meio alcalino a que algas foram sujeitas. O tempo de duração do pré-tratamento, a concentração da solução de NaOH usada, assim como o processo de neutralização das algas foram os parâmetros modificados com vista a otimizar o rendimento do posterior processo de extração. A força do gel, a quantidade de 3,6-anidrogactose e de sulfatos presente no produto obtido da extração foram as propriedades determinadas para avaliar a qualidade do ágar.

Após um conjunto de ensaios concluiu-se que os melhores rendimentos para a extração do agar foram conseguidos quando as algas eram submetidas a um pré-tratamento alcalino com uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 6% (w/w), durante 6 dias, e com a posterior neutralização por imersão numa solução aquosa de ácido sulfúrico 0,03M. Para facilitar a operacionalização dos procedimentos verificou-se que o ideal seria usar quantidades pequenas de matéria-prima (sensivelmente 25-30 gramas) e o tempo de extração ótimo obtido foi de 2,5 horas.

Após a otimização das condições do processo de extração foram realizados diversos ensaios com as condições ótimas de forma a avaliar a reprodutibilidade do processo. Foram realizados 18 experiências em condições semelhantes, tendo-se obtido rendimentos que variaram entre 29,14% e 47%. O ágar extraído foi analisado de forma a avaliar a sua qualidade, apresentando uma força do gel entre 54,51 g/cm² e 200,85 g/cm² um teor de 3,6-anidrogactose entre 33,58% e 45,13 e, ainda, um teor de sulfato a variara entre 0,42% e 0,96%. A dispersão dos resultados provavelmente resulta da não uniformização das características da matéria-prima e também da dificuldade em reproduzir exatamente os procedimentos durante o processo de extração do ágar. Contudo, em geral, os parâmetros de qualidade determinados para o ágar extraído encontram-se dentro das especificações para este ser comercializado.

Palavras chave: Ágar; Gel; Algas Vermelhas (*Rhodophyta*); Extração; *Gracilaria*; *Gracilaria vermiculophylla*; 3,6-Anidrogactose; Sulfato; Força-gel; pré-tratamento alcalino.

Abstract

This study intention was to evaluate the potential of algae collected vermiculophylla *Gracilaria* species, in the years 2013-14, a fish farm installed in the Ria de Aveiro (40 ° 38 '00 "N, 84 ° 44' 00" W) as raw material for the production of agar.

According to the literature, the algae of the gender *Gracilaria* require treatment prior to extraction step. Although there is reference to different types of pre-treatment in this study was only evaluated pre-treatment of the algae at ambient temperature in an alkaline environment using sodium hydroxide as base.

The agar, also known as agar-agar or agarose, is a biopolymer that can be extracted from various species of red algae belonging to Rhodophyta class being present in the cell wall of the same. Has very different characteristics compared to other biopolymers and their content in red algae varies depending on the habitat where they are. This species of algae develops not only in "wild" areas but can also develop in the tanks used for fish production in aquaculture, which is a problem in the fishing period, having the need for their periodic removal. These algae removed consist in the industrial waste for this activity. In order to work around this environmental problem, there was a study in order to value this residue by Agar extraction, a product with enough commercial value. The agar is characterized by being insoluble in cold water and absorb large amounts of water at high temperature, forming a gel after cooling. This gel is a product widely used for applications in the food industry, and the algae of the gender *Gracilaria* are the main source of agar for this industry.

In this dissertation, algae vermiculophylla *Gracilaria* species harvested in the Ria de Aveiro for agar extraction were used. It was confirmed that after an appropriate pre-treatment they produce quality agar to be used in the food industry. Thus, the extraction process of agar from algae was optimized with the objective of increasing the yield of the process and final product quality in terms of some of its most important properties. For this purpose, several parameters of the pre-treatment has been individually altered in the alkaline environment that algae were subject before proceeding to the extraction of agar. The duration of the pre-treatment time, the concentration of the NaOH solution used, as well as the neutralization process of the algae were the modified parameters in order to optimize the yield of the subsequent extraction process. The gel strength, the amount of 3,6-anhydrogalactose and sulfate present in the product obtained from the extraction are the properties that were determined to evaluate the quality of the agar.

After a number of trials it was concluded that the best yields for the extraction of agar were achieved when the algae were subjected to an alkaline pre-treatment with an aqueous solution

of sodium hydroxide to 6% (w / w) for 6 days, and the subsequent neutralization by immersion in an aqueous solution of 0.03 M sulfuric acid. To facilitate the implementation of the procedures it was verified that the ideal would be to use small amounts of raw material (roughly 25-30 grams) and the optimal extraction time obtained was 2.5 hours.

After optimization of the extraction process conditions were performed various tests with the optimal conditions in order to evaluate the reproducibility of the process. 18 experiments were conducted under similar conditions, having obtained yields which ranged from 29.14% to 47%. Extracted Agar was analyzed in order to evaluate their quality, having a gel strength between 54.51 and 200.85 g/m² one 3,6-anhydrogalactose content of between 33.58% and 50.97 and furthermore, a sulfate content between 0.42% and 0.96%. The dispersion of results probably results from non-standard characteristics of the raw material and also the difficulty in reproducing the exact procedures during the agar extraction process. However, in general, the quality parameters determined for the agar extracted are within specifications for this to be commercialized.

Keywords: Agar; Gel; Red algae (Rhodophyta); extraction; Gracilaria; Gracilaria vermiculophylla; 3,6-anhydrogalactose; Sulfate; Gel Strength; alkaline pre-treatment.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract.....	XI
Índice Geral	XIII
Abreviaturas	XX
1. Introdução.....	- 1 -
1.1. Enquadramento do tema	- 1 -
1.2. Objetivos da Dissertação	- 2 -
1.3. Estrutura da dissertação	- 3 -
2. Das algas vermelhas ao ágar	- 7 -
2.1. Algas Marinhas.....	- 7 -
2.2. Algas vermelhas – <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	- 9 -
2.3. Ágar.....	- 11 -
2.3.1. História do ágar	- 11 -
2.3.2. Estrutura química do ágar.....	- 12 -
2.4. Propriedades mecânicas e físico-químicas do ágar	- 14 -
2.4.1. Força do gel	- 14 -
2.4.2. Gelificação.....	- 14 -
2.4.3. Viscosidade	- 15 -
2.4.4. Estabilidade	- 15 -
2.5. Produção de ágar em Portugal	- 17 -
2.6. Extração e purificação de ágar	- 17 -
2.6.1. Descrição simplificada do processo de extração do ágar.....	- 17 -
2.6.2. Extração das algas: <i>Gracilaria</i> vs. <i>Gelidium</i>	- 19 -
3. Materiais e métodos	- 23 -
3.1. Instalação laboratorial e recursos utilizados.....	- 23 -
3.1.1. Matéria-prima	- 25 -

3.2.	Pré-tratamento.....	- 26 -
3.2.1.1.	Otimização das condições do pré-tratamento	- 27 -
3.2.1.2.	Neutralização.....	- 28 -
3.3.	Extração	- 30 -
3.3.1.	Tempo de extração.....	- 30 -
3.3.2.	Filtração das algas e recuperação do ágar	- 32 -
3.3.3.	Cálculo da humidade das algas	- 34 -
3.4.	Avaliação da qualidade do ágar.....	- 34 -
3.4.1.	Cálculo do rendimento da extração.....	- 35 -
3.4.2.	Quantificação da força gel	- 35 -
3.4.3.	Quantificação de 3,6-anidrogactose.....	- 36 -
3.4.3.1.	Preparação das amostras de ágar para análise de 3,6-anidrogactose-	37
	-	
3.4.3.2.	Procedimento experimental para a quantificação de 3,6-anidrogactose...	37 -
3.4.3.3.	Obtenção da curva de calibração com D-frutose	- 38 -
3.4.4.	Quantificação de sulfato	- 42 -
3.4.4.1.	Preparação das amostras de ágar para análise do teor em sulfato	- 42 -
3.4.4.2.	Procedimento experimental para a quantificação do teor de sulfato	- 43 -
3.4.4.3.	Obtenção da curva de calibração para o sulfato	- 43 -
4.	Resultados experimentais e discussão	- 47 -
4.1.	Otimização das condições de operação da extração do ágar	- 47 -
4.1.1.	Massa de algas usada na extração.....	- 49 -
4.1.2.	Efeito da concentração da solução alcalina e do tempo do pré-tratamento.-	50 -
4.1.2.1.	Concentração de NaOH no pré-tratamento.....	- 51 -
4.1.2.2.	Tempo do pré-tratamento	- 52 -
4.1.2.3.	Tempo de extração.....	- 53 -
4.1.3.	Processo de neutralização.....	- 53 -
4.1.4.	Caracterização do ágar obtido nas extrações realizadas para a otimização do processo	- 55 -
4.1.4.1.	Quantificação da força gel	- 55 -

4.1.4.2.	Quantificação de 3,6-anidrogactose e do teor de sulfato	58 -
4.2.	Processo de extração com as condições de operação otimizadas	60 -
4.2.1.	Rendimento	61 -
4.2.2.	Força gel do ágar	62 -
4.2.3.	Quantificação de 3,6-anidrogactose e sulfato	64 -
4.2.4.	Análise estatística dos resultados.....	66 -
5.	Conclusão.....	72 -
6.	Referencias bibliográficas.....	76 -
7.	Apêndices.....	82 -
7.1.	Valores intermédios calculados	82 -
7.2.	Preparação da solução de cloreto de bário em gelatina	89 -
7.3.	Diagrama de extremos e quartis.....	90 -

Índice de Figuras

Figura 2-1	Classificação taxonómica das <i>Rhodophyta</i>	8 -
Figura 2-2	Algas da espécie <i>Gracilaria vermiculophylla</i>	10 -
Figura 2-3	Exemplos de algumas algas vermelhas.....	10 -
Figura 2-4	Estrutura química do ágar (agarose com agarpectina) Fonte: (AGARGEL, 2003)-	12 -
Figura 2-5	Diversas áreas de utilização do ágar	13 -
Figura 2-6	Esquematização do processo de extração de ágar das algas do género <i>Gracilaria</i>	19 -
Figura 3-1	Vista aérea da piscicultura da Ria de Aveiro, local da recolha das algas <i>Gracilaria</i> utilizadas nesta dissertação (40° 38' 00" N; 84° 44' 00" W); B) Biomassa após a colheita para lavagem com água e remoção de materiais estranhos; C) Aspeto seco da <i>Gracilaria</i>	25 -
Figura 3-2	Algas da primeira extração após filtração do agar.	26 -
Figura 3-3	Algas durante o pré tratamento em meio alcalino.	27 -
Figura 3-4	Exemplo de uma extração recorrendo previamente a um choque ácido numa solução aquosa de H ₂ SO ₄ 0,1M durante 15 minutos.....	28 -

Figura 3-5 Solução recuperada de uma extração de ágar após um pré-tratamento com um choque ácido.	- 29 -
Figura 3-6 Primeira extração realizada.	- 30 -
Figura 3-7 Extrações de ágar realizadas em copos de vidro com uma capacidade de 2 L.-	31
-	
Figura 3-8 Precipitação do Agar em etanol.	- 31 -
Figura 3-9 Filtração inicial em rede metálica	- 32 -
Figura 3-10 Imagens do ágar durante o processo de congelamento/descongelamento e secagem. 1 - ágar após a filtração que depois de atingir a temperatura de gelificação foi cortado aos pedaços para facilitar o seu armazenamento no congelador; 2 - descongelamento do ágar; 3 - ágar colocado sobre a película de acetato e pronto a ser seco na estufa a 60°C (4).	- 33 -
Figura 3-11 Amostra de ágar depois de seco na estufa.	- 33 -
Figura 3-12 Imagem recolhida durante um ensaio de força gel.	- 36 -
Figura 3-13 Amostras das soluções de D-frutose para obtenção da curva de calibração para a quantificação de 3,6-anidrogactose: 1) Banho-maria com as amostras para a análise do teor de 3,6-anidrogactose. 2) Depois de removidos do banho termoestabilizado a 80°C, é visível a diferença de tonalidade das misturas que correspondem a diferentes teores de 3,6-anidrogactose. 3) Após a adição de 10 mL de etanol verifica-se uma mudança de tonalidade.	- 38 -
Figura 3-14 Primeira curva de calibração obtida para a D-frutose. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.	- 39 -
Figura 3-15 Repetição da curva de calibração obtida para a D-frutose. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.	- 40 -
Figura 3-16 Curva de calibração efetiva para a D-frutose e que foi usada na quantificação de 3,6-anidrogactose. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.	- 41 -
Figura 3-17 Curva de calibração obtida para o sulfato. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.	- 44 -

Figura 4-1 Rendimento da extração para grupos de experiências em que se variou a massa de algas usada. [PT] significa concentração de NaOH no pré-tratamento e T diz respeito aos dias de pré-tratamento de cada ensaio.....	49 -
Figura 4-2 Rendimento da extração para grupos de experiências em que se variou a concentração de NaOH a usar no PT. T diz respeito aos dias de pré-tratamento de cada ensaio.....	51 -
Figura 4-3 Rendimento da extração para grupos de experiências realizadas com [PT]=6% em que se variou o tempo de PT.[PT] significa concentração de NaOH no pré-tratamento. ...	52 -
Figura 4-4 Rendimento da extração para grupos de experiências realizadas com [PT]=6% em que se variou o tempo de extração .[PT] significa concentração de NaOH no pré-tratamento.	53 -
Figura 4-5 Rendimento para duas extrações realizadas em condições semelhantes, mas com diferentes procedimentos na fase de neutralização das algas.	54 -
Figura 4-6 Força gel para o ágar obtido de algas submetidas a diferentes soluções alcalinas durante o PT. Note-se que as barras representam a média dos triplicados realizados para cada amostra de ágar a linha horizontal a pontado representa o limite de inferior da força gel para o ágar ser considerado como um bom ágar.....	56 -
Figura 4-7 Valores de sulfato e de 3,6-anidrogactose para os ensaios realizados com o objetivo de otimizar o processo de extração. A linha horizontal a pontado representa o valor de referência considerado para o teor de sulfato no ágar Villanueva (2009).....	58 -
Figura 4-8 Valores de rendimento obtidos em todas as extrações realizadas depois da otimização do processo. A linha vertical sobre a barra representa o desvio padrão dos resultados.	61 -
Figura 4-9 Força gel medida para o gel do ágar obtido em diferentes extrações com as condições ótimas. As linhas verticais sobre as barras dizem respeito ao desvio padrão dos ensaios em triplicado realizados com cada amostra, ou ao desvio padrão das médias dos ensaios realizadas com as diversas amostras. A linha a pontado indica o limite mínimo da força gel segundo valores de referência	62 -

Figura 4-10 Quantificação de 3,6-AG nas amostras de ágar obtidas nas extrações realizadas com as condições otimizadas. As linhas verticais sobre as barras dizem respeito ao desvio padrão dos ensaios em triplicado realizados com cada amostra, ou ao desvio padrão das médias dos ensaios realizadas com as diversas amostras.	- 64 -
Figura 4-11 Quantificação do sulfato nas amostras de ágar obtidas nas extrações realizadas com as condições otimizadas. As linhas verticais sobre as barras dizem respeito ao desvio padrão dos ensaios em triplicado realizados com cada amostra, ou ao desvio padrão das médias dos ensaios realizadas com as diversas amostras. Note-se que o limite máximo indicado a 2% segue como referência Villanueva (2009).	- 65 -
Figura 4-12 Diagramas de extremos e quartis para os diversos parâmetros determinados nas extrações com as condições de operação otimizadas. 1- rendimento das extrações 2-força gel 3- 3,6-AG 4-Sulfato	- 67 -

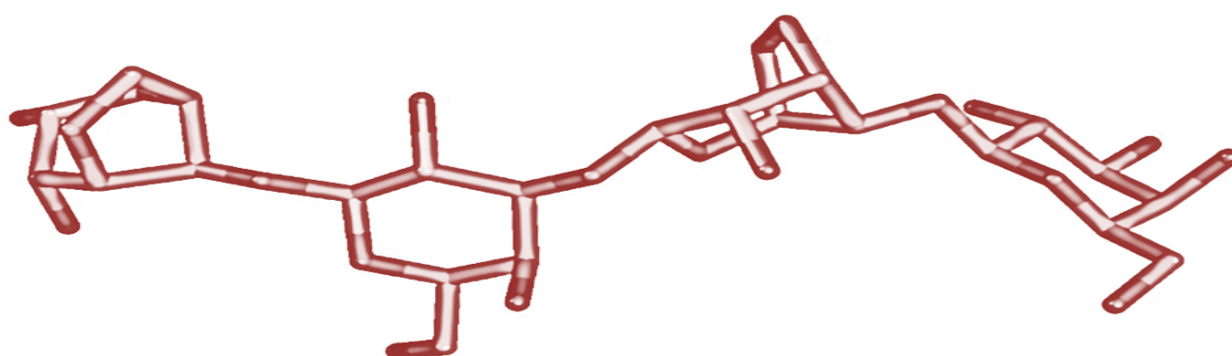
Índice de Tabelas

Tabela 2-1 Resumo das propriedades físico-químicas do ágar retirado de (Jarro, 2010).-	16 -
Tabela 3-1 Equipamentos necessários para a realização experimental	- 23 -
Tabela 3-2 Reagentes necessários para a realização experimental	- 24 -
Tabela 4-1 Rendimento das extrações realizadas, sem e com pré-tratamento das algas, tendo-se modificado as condições do PT (concentração da solução alcalina e tempo), assim como a massa de matéria-prima e o tempo de extração.	- 48 -
Tabela 7-1 Resultados dos ensaios de Força-Gel obtidos	- 82 -
Tabela 7-2 Valores para o cálculo da 3,6-Anidrogactose	- 85 -
Tabela 7-3 Valores para o calculo do teor de Sulfato do ágar.....	- 86 -
Tabela 7-4 Organização dos resultados das extrações ótimas para a realização dos diagramas de extremo e quartis	- 90 -
Tabela 7-5 Valores necessários à representação dos diagramas de extremos e quartis respectivos aos valores da Tabela 7-4.....	- 91 -

ABREVIATURAS

Abreviatura	Simbologia
-------------	------------

ISEC	Instituto Superior de Engenharia de Coimbra
DEQB	Departamento de Engenharia Química e Biológica
ESAC	Escola Superior Agrária de Coimbra
LEQ	Laboratório de Engenharia Química
PT	Pré-tratamento
3,6-AG	3,6-Anidrogactose
[PT]	Pré-tratamento
Exp.	Experiência



CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento do tema

Em Portugal a apanha de algas é uma atividade que remonta ao século XII (Veiga, 1975). As algas eram recolhidas nas zonas costeiras e vendidas como fertilizantes (Duarte, 1994). A partir da década de 40, a recolha das algas passou a ser feita com vista à extração de coloides, embora limitada à recolha das algas que chegavam à costa, sendo exportadas na sua totalidade. Em 1964 foi estabelecida a primeira legislação sobre a exploração de algas, tendo sido proibida a sua exportação como matéria-prima e apenas em 1967 foi regulamentada a apanha de algas por mergulhadores. A apanha industrial de algas para a produção de ágar iniciou-se em Portugal após a II Guerra Mundial, mais propriamente no ano de 1947. As espécies *Gelidium sesquipedale* no litoral continental e *Pterocladia capillacea* nos Açores foram, desde então, utilizadas na extração de ágar de alta qualidade caracterizado por uma força gel e pureza elevados e de grande procura por parte do mercado internacional (Vivek, et al., 2009). Em 1971, Portugal possuía seis fábricas dedicadas à extração do ágar a partir destas duas espécies de algas, considerando-se portanto como um dos maiores países produtores mundiais de ágar. Destas seis fábricas, apenas uma ainda se encontra em atividade, a Iberagar (Pereira, 2007). A exportação do ágar produzido em Portugal para países como a Alemanha Federal, Espanha, Itália, Japão e União Soviética atingiu o auge no início dos anos 70. Nos anos seguintes houve uma diminuição importante desta atividade face à sobre-exploração dos recursos naturais. O desequilíbrio verificado entre a procura do ágar proveniente das algas dos géneros *Gelidium* e *Pterocladia* e a rotura das reservas naturais mundiais fez com que a indústria extratora entrasse em crise. Desde então, a preocupação sobre a possibilidade de sobre-exploração dos recursos existentes, tem vindo a crescer, verificando-se o aumento da investigação aplicada, principalmente nas áreas da produção de ficocolóides e técnicas de cultivo das algas (Magne, 1993).

Enquanto as algas do género *Gelidium* provêm maioritariamente dos escassos recursos naturais, as algas do género *Gracilaria* são mais abundantes, em parte, como resultado do avanço técnico que permite atualmente o cultivo de várias destas espécies à escala comercial em vários países e regiões do mundo, mas também graças à tolerância que a maior parte destas espécies mostram em relação a diferentes condições abióticas. A sua adaptação às mais diversas condições ambientais facilita a sua disseminação, muitas vezes com carácter invasivo dos mais variados ecossistemas aquáticos.

A *Gracilaria vermiculophylla*, por exemplo, é uma espécie oriunda do Oceano Pacífico, atualmente disseminada um pouco por toda a parte incluindo o Oceano Atlântico (BIOLOGICAL, et al., 2011). Em Portugal, os estuários das rias Formosa e de Aveiro são

Capítulo 1

exemplos de dois ecossistemas afetados pela proliferação desta alga. Esta espécie caracteriza-se por se reproduzir todo o ano, germinando e crescendo numa ampla gama de condições ambientais o que ajuda a explicar a sua distribuição e particular abundância na Ria de Aveiro (BIOLOGICAL, et al., 2011).Atualmente considerada uma espécie invasora neste ecossistema, a *Gracilaria vermiculophylla* pode, no entanto, tornar-se uma importante mais-valia, se aproveitada para extração de ágar. Apesar do seu rendimento e qualidade inferiores, quando comparado com uma extração realizada a partir de algas do género *Gelidium*, o ágar extraído de diferentes espécies do género *Gracilaria* têm vindo a melhorar as suas características em particular após a descoberta de que a hidrólise alcalina dos grupos sulfato do ágar aumentaria a força do gel, motivando a que cada vez mais espécies pertencentes ao género *Gracilaria* sejam utilizadas na produção de ágar para aplicação na indústria alimentar (Yoshimura, 2006). Assim, as características do ágar produzido a partir de algas do género *Gracilaria*, e consequentemente a sua aplicação comercial, dependerão da fonte de matéria-prima (espécie e habitat) e das condições escolhidas para pré-tratamento e extração das algas.

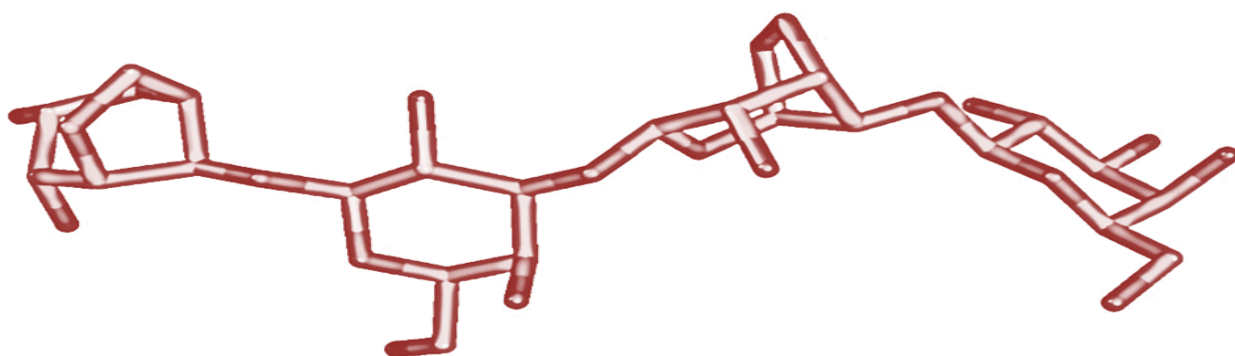
1.2. Objetivos da Dissertação

A presente dissertação teve como objetivo principal a caracterização do ágar proveniente da extração da alga vermelha *G.vermiculophylla* e o estudo das suas possíveis aplicações.

Em verdade, com o decorrer deste projeto caracterizou-se o ágar extraído da *G.vermiculophylla*, comprovando a sua qualidade como agente gelificante e espessante. Após este objetivo alcançado, determinaram-se quais os parâmetros que conduziam a uma extração ótima. Todos estes critérios valorizavam portanto o recurso a matérias-primas renováveis como é o caso das algas utilizadas da espécie *G.vermiculophylla*, existente em grandes quantidades na Ria de Aveiro e, no caso concreto das usadas nesta dissertação, constituíam um resíduo de uma indústria de piscicultura. Com base em todo o processo desenvolvido na presente dissertação, demonstrou-se o grande espectro de potenciais aplicações que o ágar possui e que o colocam numa posição fundamental e privilegiada face ao avanço constante da indústria e da tecnologia.

1.3. Estrutura da dissertação

A presente dissertação divide-se essencialmente em 6 capítulos. No capítulo 1 encontra-se uma introdução sobre a temática abordada com o respetivo enquadramento do tema e os objetivos a serem cumpridos durante a elaboração do presente trabalho. No capítulo 2, foi realizada uma revisão bibliográfica que inclui os estudos mais importantes para a realização deste trabalho. O capítulo 3, descreve todos os procedimentos experimentais adotados e também algumas observações experimentais. No capítulo 4 são expostos e discutidos todos os resultados experimentais obtidos, com o intuito de ser alcançado o procedimento experimental ótimo para uma extração. Com base nestes resultados e em resposta ao objetivo dos mesmos surge, então, o capítulo 5 onde se encontram todos os resultados experimentais das extrações realizadas em condições ótimas, ou seja, após a otimização da metodologia do processo de extração, foi realizado um conjunto de extrações que incluíam a otimização das condições de operação do processo em si. O capítulo 6 conclui de uma forma geral todos estes resultados para um possível futuro estudo realizado com a mesma espécie de algas.



CAPÍTULO 2 – DAS ALGAS VERMELHAS AO ÁGAR

2. DAS ALGAS VERMELHAS AO ÁGAR

Neste capítulo será realizada a contextualização da temática da dissertação desenvolvida e serão apresentados não só os conceitos fundamentais para a compreensão do mesmo, bem como, será realizada uma breve exposição das propriedades do ágar.

2.1. Algas Marinhas

As algas marinhas dividem-se em vários subgrupos: *Chlorophyta* (algas verdes); *Phaeophytas* (algas castanhas), as *Rhodophyta* (algas vermelhas) e as *Cyanophyta* (algas azuis).

O termo algas, *latu sensu*, encontra-se diretamente relacionado com um grupo artificial de organismos que pouca coisa têm em comum, a não ser o fato de serem predominantemente aquáticos, fotossintetizantes; de conterem “*clorofila a*” e de serem carenciados, não só num tecido constituído de células estéreis que envolvem os órgãos de reprodução, como também num sistema diferenciado para condução de água, circulação de fluidos, sais minerais e outros nutrientes. Deste modo, são definidos como sendo grupos polifiléticos que não constituem uma categoria taxonómica bem definida, mas sim um amontoado de categorias díspares, tão diversas que chegam a ser classificadas em dois ou três reinos diferentes, tradicionalmente conhecidos como *Monera*, *Protista* e *Plantae* (Battacharya, et al., 1998). Atualmente, a classificação mais correta, posiciona todas as algas no reino *Protista* (Lee, et al., 1992). Em muitos ecossistemas aquáticos, as algas atuam como produtores primários na cadeia alimentar, uma vez que sintetizam o material orgânico e o oxigénio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (Lee, et al., 1992). Relativamente à morfologia, as algas são consideradas como organismos unicelulares, coloniais e filamentosos (Ogawa, et al., 1987).

Embora pertençam a vários grupos taxonómicos, são separadas de um modo bastante grosseiro, em dois grandes grupos: as algas microscópicas (microalgas) e as algas macroscópicas (macroalgas) sendo que, esta separação reside essencialmente na diferença de tamanhos existentes (AQUICULTURA, 1997). Tal diversidade de organismos encontra-se distribuída em diversos habitats (oceanos, corpos de águas doces, solos, rochas e superfícies de vegetais). Realizando uma abordagem botânica, as algas macroscópicas, são classificadas tendo em conta a sua estrutura física, função e ciclo reprodutivo. Deste modo, são divididas em: *Chlorophyta* (algas verdes), *Phaeophyta* (algas pardas) e *Rhodophyta* (algas vermelhas). Em boa verdade, as algas marinhas representam um dos maiores bio

recursos, uma vez que existem sensivelmente 150 mil espécies, onde mais de 3.000 são taxonomicamente identificadas. As *Rhodophyta* são portanto um grupo de organismos que apresenta uma grande diversidade. Apresentam aproximadamente 6.000 espécies, sendo diferenciadas dos outros grupos de algas pela combinação de algumas características (Raven, et al., 2001). Caracterizam-se por possuírem pigmentos de *clorofila a*, *clorofila d*, *carotenoides* e *ficobilinas* sendo estas responsáveis pela cor verde das *clorofilas*, proporcionando à alga o seu tom avermelhado característico. Devida à ficoeritrina que contêm, absorvem a luz azul, fazendo com que possam sobreviver a profundidades muito superiores relativamente às outras. A parede celular das *Rhodophyta*, assim como das *Phaeophyta* e *Chlorophyta*, têm como componente principal a celulose (Raven, et al., 2001). A celulose presente na parede celular das *Rhodophyta* encontra-se embebida por um material amorfo e mucilaginoso, responsável pela flexibilidade, resistência e textura das algas. Este material possui como principais componentes o ágar, a carragenina e o alginato. (REBOUÇAS, 2013). Na Figura 2-1 encontra-se a classificação taxonómica das Agarófitas.

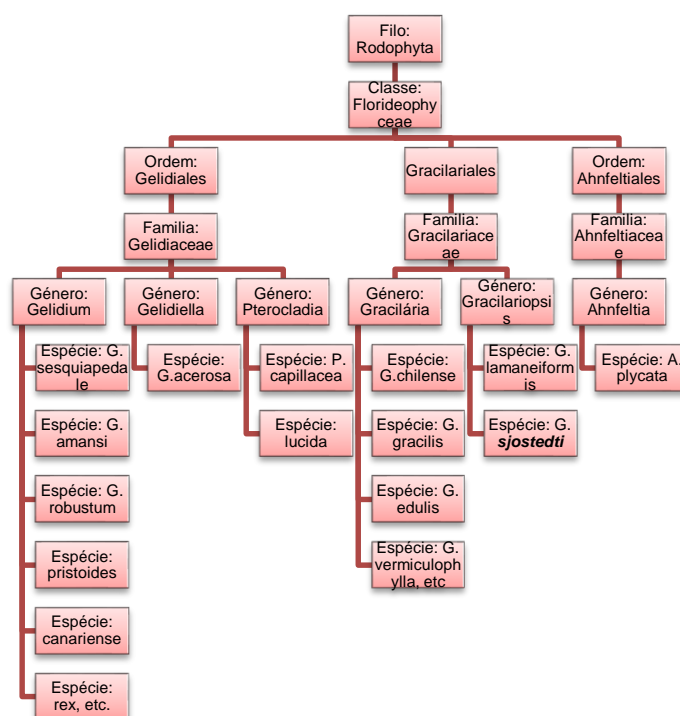


Figura 2-1 Classificação taxonómica das *Rhodophyta*

As principais espécies com valor económico superior são as agarófitas dos géneros *Gracilaria* (*Gracilariaceae*), *Gelidium* (*Gelidiaceae*), *Pterocladia* (*Gelidiaceae*) e *Ahnfeltia* (*Phyllophoraceae*); existindo outras, tais como a *Acanthopheltis* japónica, *Ceramium*

hypnaeordes e *C. boydenii*. As *Gelidium*, particularmente, a *Gelidium amansii*, oferece uma melhor qualidade do ágar, no entanto, o seu cultivo é mais difícil e encontram-se menos em recursos naturais. Já as algas do género *Gracilaria*, encontram-se com uma maior facilidade e são cultivadas em escala comercial em vários países e regiões do mundo. Esta espécie, tal como referido anteriormente, é mais abundante para produção de ágar, existindo mais de 150 tipos diferentes, sendo estes encontrados maioritariamente nas zonas de clima ameno e subtropical. As algas são, na generalidade, apanhadas manualmente por pescadores em zonas de baixa profundidade e maré baixa, ou também por mergulhadores, que recorrem a equipamentos adequados para procederem à respetiva colheita. Após a colheita, são secas ao sol até ser atingido um nível de humidade ideal para processamento (Jarro, 2010).

2.2. Algas vermelhas – *Gracilaria vermiculophylla*

De seguida é apresentada uma breve descrição da espécie de algas vermelhas utilizada na presente dissertação.

Sendo o ágar um biopolímero da classe dos poligalactanos que se encontra no material intracelular em várias espécies de algas vermelhas (algas marinhas *Rhodophyta*), é de extrema importância, então, a preservação e o cultivo desta espécie. As algas que permitem a extração de ágar (agarófitas) encontram-se nas famílias *Gracilariaceae*, *Gelidiaceae*, *Phyllophoraceae* e *Ceramiceae* (Stephen, et al., 2006). A *Gracilaria* é portanto um género de macroalga de coloração vermelha da família *Gracilariaceae*, de grande importância económica a nível mundial, uma vez que a sua capacidade de produção de Ágar, juntamente com a sua facilidade de reprodução e o seu rápido crescimento, lhe concedem um lugar de honra relativamente ao mercado económico (Jones Kaine, et al., 1995). É deste género de algas que o ágar é maioritariamente extraído. Grande parte da sua produção mundial resulta das algas do género *Gracilaria* (53%) e *Gelidium* (44%), sendo que apenas uma pequena quantidade (3%) é produzida a partir de agarófitas como a *Gelidiella* e *Pterocladia* (Marinho-Soriano, et al., 2003). Apesar das espécies do género *Gracilaria* produzirem géis tipicamente mais fracos quando comparados com as do género *Gelidium*, são consideradas as mais importantes fontes de ágar a nível mundial. Esta consideração advém do facto da sua cultura ser mais fácil, uma vez que é uma alga que cresce rapidamente e o seu custo de aquisição é menor. Relativamente à questão da qualidade do ágar não ser tão grande comparativamente com outros géis, é um ponto facilmente contornável dado que com a introdução de um pré-tratamento alcalino no processo de extração consegue-se garantir facilmente a qualidade do produto obtido. Visto por outro prisma, os géis fracos obtidos a partir do ágar extraído destas algas com o seu baixo índice de sinérese (devido ao teor altamente sulfatado), podem ser

amplamente utilizados como agentes gelificantes na produção de alimentos de textura caracteristicamente macia (Freile-Pelegrin, et al., 2004).

Em Portugal, as algas do género *Gracilaria* são facilmente encontradas na Ria de Aveiro, tornando-se assim um recurso natural de fácil acesso uma vez que existem durante todo o ano em grandes quantidades (Santos, et al., 1991).



Figura 2-2 Algas da espécie *Gracilaria vermiculophylla*.

Esta espécie, *Gracilaria vermiculophylla*, pode atingir comprimentos entre os 15 e os 100 cm, com ramificações que possuem diâmetros a variar entre os 2 e os 5 mm (ver Figura 2-2). É uma espécie bastante ramificada e com uma coloração variável, dado que pode apresentar desde um tom castanho até um vermelho tinto acinzentado, dependendo da luz solar a que está exposta (Sousa, 2008).

Tal como foi dito anteriormente, para além das algas da espécie *Gracilaria*, existem outras pertencentes ao mesmo grupo. Desde as *Porphyra* (transformadas em folhas arroxeadas após o processo de secagem, e com uma tonalidade ligeiramente negra, bastante utilizada no sushi japonês); as *Dulse* (utilizada em pequena escala como fonte de alimento ou até como um condimento na elaboração de alguns pratos); e, as *Gelidium* (amplamente utilizadas para a extração de ágar comercial). Na seguinte Figura 2-3, são apresentadas as espécies referidas anteriormente.

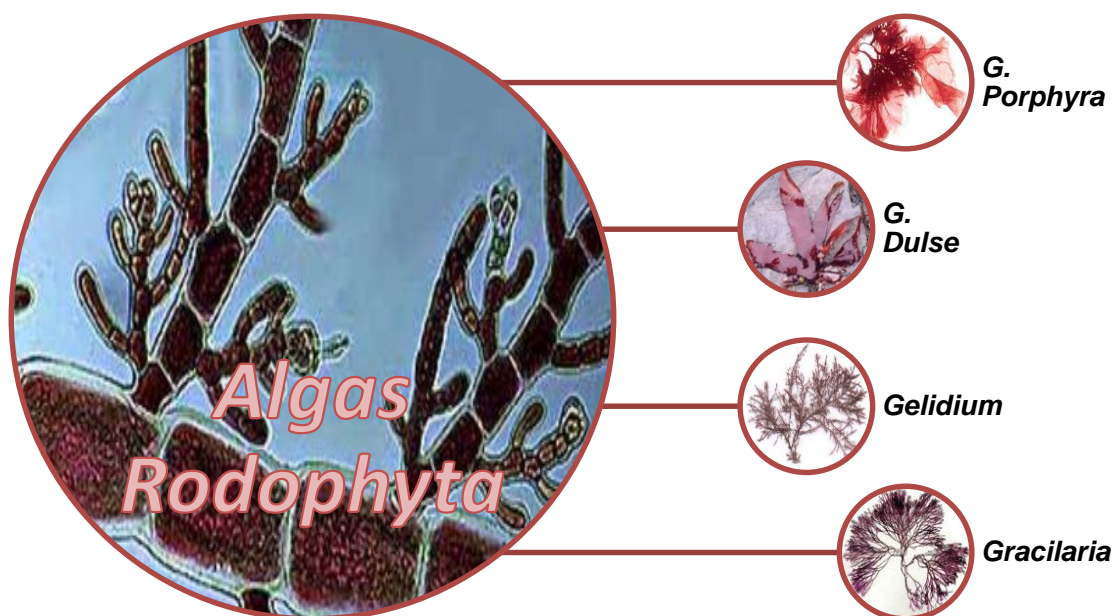


Figura 2-3 Exemplos de algumas algas vermelhas

Embora as algas utilizadas no decorrer desta dissertação provenham de uma indústria de piscicultura, existe um enorme número delas que possui um habitat natural e provêm de zonas

ditas “selvagens”. Consoante a sua espécie, são desenvolvidas em zonas específicas. Para o caso específico da presente dissertação, as algas da espécie *Gracilaria* encontram-se dispersas, tanto em países tropicais, como em águas mais frias. Os pioneiros no cultivo comercial de *Gracilaria* foram os *chilenos*, que usaram a *Gracilaria chilensis*, proveniente da costa sul, da qual é possível extrair um ágar de alta qualidade. Existem também grandes canteiros de *Gracilaria* selvagem no Chile, e foi o receio de uma possível extinção desses mesmos leitos devido ao *overharvesting* que levaram ao desenvolvimento da cultura em questão. A China, por outro lado, é das maiores produtoras de *Gracilaria*, principalmente nas províncias do sul de Guangxi e Hainan, onde esta é cultivada em lagoas e estuários.

2.3. Ágar

2.3.1. História do ágar

Segundo uma lenda originária no Japão, a primeira metodologia relativa à produção de ágar, data de meados do século XVII, mais propriamente em 1658. Nesse inverno, o imperador japonês e a sua comitiva imperial haviam-se perdido nas montanhas durante uma tempestade de neve, ficando refugiados numa pequena hospedaria. À hora de jantar, o dono da mesma, Minoya Tarozaemon, oferecera-lhes um prato tradicional à base de geleia (tendo esta sido confeccionada a partir de algas marinhas, mais especificamente da espécie *Gelidium sp.* com água). Posteriormente, os restos da geleia foram deitados fora e, devido às baixas temperaturas, congelou. Com a chegada de um novo dia, tinham verificado que estes mesmos restos tinham sido descongelados e secos devido à incidência da luz solar, tendo sido transformados, passados vários dias, em uma substância branca, seca e porosa. Tarozaemon encontrou a substância e verificou que após a fervura da mesma com água, obter-se-ia novamente uma geleia, tendo esta um aspeto mais claro que a original. Deste modo, o primeiro método de fabricação de ágar tinha portanto sido acidentalmente descoberto.

Robert Kitch utilizou pela primeira vez o ágar como meio de cultura. A produção de ágar por técnicas de congelamento modernas iniciou-se em 1921, na Califórnia, Estados Unidos, por um japonês chamado Chokichi Matsuoka, que registou a patente em 1923 (Jarro, 2010).

2.3.2. Estrutura química do ágar

Quimicamente, é considerado um polissacarídeo complexo, constituído por dois polissacarídeos, a agarpectina e a agarose. A agarose é um polissacarídeo neutro com uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose, um dímero constituído por D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose e a agarpectina é um polissacarídeo ácido que contém grupos sulfato, ácido pirúvico e ácido D-glucurónico conjugado com agarobiose (Arvizu-Higuera, et al., 2007). Na Figura 2-4 está representada a estrutura química do ágar. O ágar é portanto uma substância coloidal, porosa, muito transparente, que se quebra quando seca e carboniza sem se fundir. É solúvel em água quente, insolúvel em água fria e apresenta uma grande capacidade para aumentar de volume e para absorver água. Esta substância, mesmo em pequenas quantidades, quando misturada com água, é responsável por pontos de gelificação e fusão bem definidos da mistura, e os géis obtidos possuem como principais particularidades uma elevada força do gel e a termo reversibilidade. Este seu forte poder gelificante resulta exclusivamente das ligações de hidrogénio formadas entre as cadeias lineares do galactano, responsável pela reversibilidade térmica do ágar, com temperaturas de fusão e solidificação a diferirem em cerca de 45 °C.

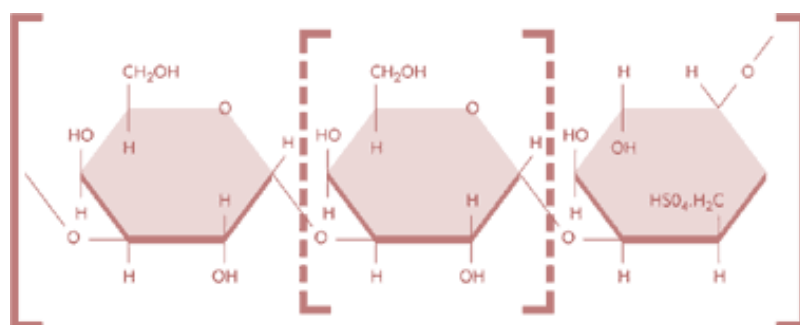


Figura 2-4 Estrutura química do ágar (agarose com agarpectina) Fonte: (AGARGEL, 2003)

O ágar possui algumas características que fazem com que se torne um meio bastante usado como agente gelificante em meios de cultura. Algumas dessas características são: a capacidade de permanecer sólido até cerca de 40 °C, de se manter estável sob temperaturas de esterilização (120° C), de não apresentar toxicidade para a generalidade dos organismos e, finalmente, o facto de ser uma substância fisiologicamente inerte, isto é, muito poucas bactérias possuem enzimas capazes de o digerir, constituindo uma vantagem relativamente a outros agentes gelificantes. O ágar, quando no estado sólido não permite trocas gasosas com a superfície, e em particular de oxigénio, o que pode ser visto como uma vantagem ou uma desvantagem dependendo da sua aplicação.

O ágar, proveniente de algas, é bastante utilizado na confecção de gelatinas por ser um tipo de fibra que é indigerível com propriedades laxativas. A preparação da gelatina com ágar proporciona uma solidificação mais rápida do que a gelatina de origem animal, mantendo a

consistência sólida à temperatura ambiente. Devido a este facto, é muito utilizada em recheios de tortas, coberturas, glacês, merengues, confeitos e produtos enlatados de carne, tirando partido de suas propriedades coloidais e gelificantes (Ornellas, 2006).

Tal como descrito anteriormente, o ágar possui essencialmente agarose e agarpectina na sua constituição, sendo considerada uma mistura complexa de polissacarídeos. A agarpectina tem baixo poder de gelificação, contrariamente à agarose que é um componente gelificante (Ferrario, et al., 1996). A concentração máxima de ágar utilizado em uma formulação é de 1% ou menos, devido ao seu alto poder gelificante. Com o decorrer do tempo, observou-se que o ágar compreende uma família de polissacarídeos, as agarenas, e que diversos tipos encontram-se presentes no ágar da mesma espécie, dependendo diretamente do aspeto fisiológico, da espécie da alga, de fatores ambientais, e, ainda, do tipo de extração usado (Florêncio, et al., 2012). Na Figura 2-5 encontra-se um esquema ilustrativo das diferentes aplicações do ágar bacteriológico e do ágar considerado como sendo ágar *standard*.

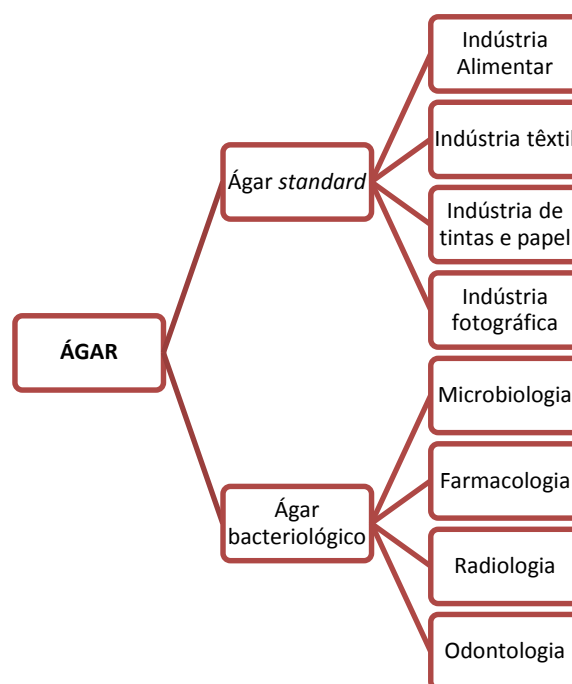


Figura 2-5 Diversas áreas de utilização do ágar

2.4. Propriedades mecânicas e físico-químicas do ágar

É necessário um vasto conhecimento da química do ágar para a compreensão das suas propriedades reológicas e das suas propriedades físicas em geral, que ditam a sua utilização final. A ressonância magnética nuclear e espectroscopia infravermelha são dois dos métodos eficazes para a caracterização estruturas destes polissacáridos (Freile-Pelegrin, et al., 2004).

Nesta secção serão descritas algumas das propriedades, mecânicas e físico-químicas, mais importantes na avaliação da qualidade de um ágar.

2.4.1. Força do gel

A força (também designada por consistência) de um gel é expressa pela força máxima que o gel consegue suportar sem apresentar rutura e é, em geral, apresentada em g/cm². A resistência do gel pode ser medida utilizando um analisador de textura (por exemplo, o modelo TA-XT2 da Stable Micro Systems) ou outro tipo de equipamentos, numa solução de ágar com 1,5 % (w/w). Estas condições experimentais foram usadas em diversos estudos Villanueva (2009) e as medições foram repetidas em amostras do gel de ágar preparado a partir de soluções diferentes. Tal como descrito anteriormente, verificou-se que a consistência do gel está dependente de um pré tratamento alcalino para a alga *Gracilaria*.

A força do gel do ágar é influenciada por diversos fatores, como a concentração, tempo de PT, pH e conteúdo de açúcar. O pH afeta de forma significativa a força do gel do ágar sendo que, um decréscimo do pH diminui a força do gel. O conteúdo de açúcar também tem um efeito considerável sobre o gel de ágar, pois o seu aumento resulta num gel com maior dureza, porém com menor coesão (Jarro, 2010).

2.4.2. Gelificação

A componente gelificante do ágar possui uma estrutura de dupla hélice. Esta estrutura agrega-se para formar uma estrutura tridimensional que retém as moléculas de água nos seus interstícios, formando, assim, tal como descrito anteriormente, géis termo-reversíveis. A formação do gel deve-se, pois, à interação das estruturas em forma de hélices.

No que se refere ao poder de gelificação, o ágar torna-se distinto entre os hidrocolóides. O gel resultante de misturas com ágar é rígido, possui uma forma bem definida e pontos de

fusão e gelificação precisos. Para além disto, demonstra claramente fenómenos interessantes de “*syneresis*” (expulsão espontânea de água através da superfície do gel em repouso) e histerese (diferença entre as temperaturas de fusão e gelificação). A gelificação ocorre a temperaturas bastante abaixo da temperatura de fusão. Este intervalo de histerese é uma propriedade do ágar recentemente explorada e que lhe confere uma variedade de aplicações no setor alimentar (Jarro, 2010).

2.4.3. Viscosidade

Segundo Jarro (2010) e Sousa (2008), a viscosidade de uma solução de ágar é influenciada e dependente da fonte da matéria-prima. A viscosidade a temperaturas acima do seu ponto de gelificação é relativamente constante quando o valor de pH varia de 4,5 a 9,0 e não é muito afetada pela idade, ou pela força iónica, para a gama de pH de 6,0 a 8,0. Entretanto, iniciada a gelificação, a temperatura constante, a viscosidade aumenta com o tempo.

2.4.4. Estabilidade

Uma solução de ágar possui uma carga levemente negativa. A sua estabilidade depende de dois fatores: da hidratação e da carga elétrica. A remoção de ambos os fatores tem como resultado a floculação do ágar. Soluções de ágar submetidas a temperaturas elevadas por períodos prolongados podem ser degradadas, resultando, assim, uma diminuição da força do gel após a diminuição da temperatura e quando este é formado. Este efeito de diminuição da força do gel é intensificado com o decréscimo do pH (Jarro, 2010). Logo, a exposição de soluções de ágar a altas temperaturas e um pH inferior a 6,0 por períodos prolongados deve ser evitada. O ágar na forma seca não está sujeito a contaminação por microrganismos. No entanto, soluções e géis de ágar são meios férteis de contaminação por bactérias e fungos, pelo que devem ser tomadas as devidas precauções para evitar o crescimento de microrganismos. Na Tabela 2-1 estão indicadas as especificações do ágar comercializado pela empresa Agargel. (AGARGEL, 2003).

Tabela 2-1 Resumo das propriedades físico-químicas do ágar retirado de (Jarro, 2010)

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
Aparência	Pó amarelado
Gronulometria	Mesh 100
Umidade	Máx. 18%
Absorção de Água	Máx. 75 c.c.
Cinzas Insolúveis em Ácido	Máx. 0,5%
Cinzas Brutas	Máx. 6,5%
Materiais Orgânicos Estranhos	Máx. 1,0%
Materiais Insolúveis Estranhos	Máx. 1,0%
Gelatina	Negativo
pH	6,8 a 7,0
Força de Gel (sol 1,5% a 20°C)	700 a 1.000g/cm ²
Viscosidade (sol 1,5% a 20°C)	10 a 100 cps
Ponto de Fusão	85° - 95°C
Ponto de Gelificação	32° - 45°C
Solubilidade	Água em ebulição
Arsênico	Máx. 3 ppm
Metais Pesados	Máx. 10 ppm
Amido	Passa o teste
Chumbo	Máx. 10 ppm
PROPRIEDADES MICROBIOIÓGICAS	
Contagem de Aeróbios Totais	< 5.000 UFC/g
E.Coli	Ausente
Salmonella	Ausente
Contagem Coliformes Totais	< 100 UFC/g

2.5. Produção de ágar em Portugal

A espécie utilizada na presente dissertação é, tal como descrito anteriormente, uma importante fonte de ágar, existente abundantemente em Portugal, mais precisamente, na Ria de Aveiro. As empresas ibéricas de extração de ágar utilizam maioritariamente matéria-prima importada de países de África, da América do Sul e China. Segundo Sousa (2008), seria portanto uma mais-valia para a indústria portuguesa a utilização da matéria-prima nacional, uma vez que permitiria um enorme controlo, não só nas despesas de importação, como também nas condições de cultura das algas, permitindo desde logo uma homogeneidade na matéria-prima e, consequentemente, no ágar extraído. Outros aspetos a ter em conta dizem não só respeito à existência de locais disponíveis para o cultivo desta espécie de algas, nomeadamente, as salinas desativadas de Aveiro, como também à indústria do setor da piscicultura. Em condições favoráveis, as indústrias de piscicultura obtêm como “resíduo” nos aquíferos as algas do género *Gracilaria*, pelo que, seria uma mais-valia para este tipo de indústria a comercialização desta matéria.

2.6. Extração e purificação de ágar

O ágar é comercializado em diferentes formas e feitios sendo que, é utilizado consoante a finalidade do produto. Dependendo do tipo de indústria em questão, o ágar pode ser encontrado em pó, flocos, barras e fios. Na indústria culinária, as formas de flocos, barras e os fios são o que melhor se adequam para os vários tipos de produtos finais. A obtenção do ágar em pó ou em flocos é realizada através de duas metodologias: *gel press* ou precipitação em solventes. O método de precipitação em solventes, é cada vez menos utilizado uma vez que, atualmente, acarreta um elevado custo e uma baixa eficiência face ao método do *gel press*. Relativamente ao ágar produzido em forma de barras e fios, a sua produção é realizada através de um sistema tradicional mais artesanal (AGARGEL, 2003).

2.6.1. Descrição simplificada do processo de extração do ágar

O processo de extração do ágar deverá ser iniciado com a lavagem da alga para remover corpos estranhos, sendo depois imersa em água e aquecida durante várias horas. O ágar dissolve-se na água e a mistura resultante é filtrada para remover ainda alguns resíduos que eventualmente ainda existam. O filtrado, ainda quente, é arrefecido formando um gel (gelatina)

que, em geral, contém cerca de 1% de ágar. Este gel é partido em pedaços e, por vezes, lavado para remover os sais solúveis e também, se necessário, pode ser tratado com lixívia para ser branqueado. Em seguida, a água é removida do gel, ou por um processo de congelação-descongelação ou utilizando pressão. Após este tratamento, a água restante é removida por secagem num forno de ar quente. O produto é então moído até um tamanho de partícula adequado e homogéneo.

No entanto, para uma melhor compreensão do processo, alguns dos detalhes e dificuldades têm de ser descritos. Existem algumas diferenças no tratamento da alga antes de serem submetidas ao processo de extração, dependendo do género utilizado. A *Gelidium* é simplesmente lavada para remover areia, sais, conchas e outros materiais estranhos e é, então, colocada em tanques para a extração com água quente. A *Gracilaria* também é lavada, mas deve ser previamente tratada antes de ocorrer a extração. Este pré-tratamento pode ser realizado de diversas maneiras: em meio alcalino, a quente ou a frio, em meio ácido ou, ainda, em meio ácido seguido da adição e extração em CaCl_2 . Relativamente ao pré-tratamento em meio alcalino, este é responsável por uma alteração química no ágar de *Gracilaria*, da qual resulta um ágar com um “poder de gel” superior. Sem este pré-tratamento alcalino, a maioria das algas das espécies de *Gracilaria* produzem um ágar com uma força de gel que é demasiado baixa para uso comercial. Para o tratamento alcalino, a alga é imersa numa solução aquosa de hidróxido de sódio, entre 2 a 5% (w/w), e aquecida a 85-90 °C durante 1 hora. A concentração da solução básica a usar varia com as espécies de alga e é determinada através de testes em pequena escala. Após a remoção da solução básica, a alga é lavada com água, e, por vezes, com uma solução de um ácido fraco para neutralizar qualquer álcali residual. Procede-se, então, à extração da alga em água a uma temperatura de ± 90 °C durante 2 horas. Após a extração, as algas são filtradas e o líquido remanescente começa a apresentar uma textura com características gelificantes à medida que vai arrefecendo. O próximo passo será o de separar o ágar existente na mistura obtida. Este processo pode ser realizado através do congelamento seguido de descongelamento do gel ou, em alternativa, através da *syneresis*. Este é o termo utilizado para designar a separação do líquido a partir de um gel. Este processo baseado em *syneresis* tem sido bastante adotado por grandes produtores de ágar que conseguem suportar os custos de capitais mais elevados para a aquisição de equipamento que usa a pressão para promover a separação do líquido do gel (McHugh, 2003).

2.6.2. Extração das algas: *Gracilaria* vs. *Gelidium*

O ágar proveniente tanto das algas *Gracilaria* como da *Gelidium* é recuperado através da extração com água a temperaturas acima do ponto de fusão dos seus géis ($\pm 85\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este processo extrativo é realizado tanto em condições ácidas, neutras ou até básicas, dependendo do tipo de alga e do objetivo final pretendido. No caso da *Gracilaria*, como é um género de algas com elevado teor em sulfatos em relação ao género *Gelidium*, é necessário efetuar um pré-tratamento (PT) em meio alcalino, antes da extração, tal como já foi referido. O objetivo do PT é eliminar os grupos sulfatados e aumentar o conteúdo em 3,6-anidrogálatose. Segundo Chirapart e os seus coautores (1995), estas modificações químicas na estrutura do ágar melhoram as propriedades gelificantes do produto final e aumentam o seu valor comercial. Por outro lado, a extração ácida melhora o rendimento do processo Ágar, pelo que pode ser usada uma combinação de um PT alcalino com uma extração em meio ácido. Já o ágar extraído das algas *Gelidium*, para além de não precisar de qualquer tipo de pré-tratamento, é um ágar bastante mais forte. O biopolímero é recuperado do extrato por um processo de congelamento-descongelamento, ou seja, o extrato obtido é congelado, e posteriormente, deixado a descongelar à temperatura ambiente de forma a separar-se o ágar da água e sais dissolvidos. O biopolímero obtido é, então, seco numa estufa. De uma forma muito geral, o processo de extração do Ágar da *Gracilaria* encontra-se esquematizado na Figura 2-6.

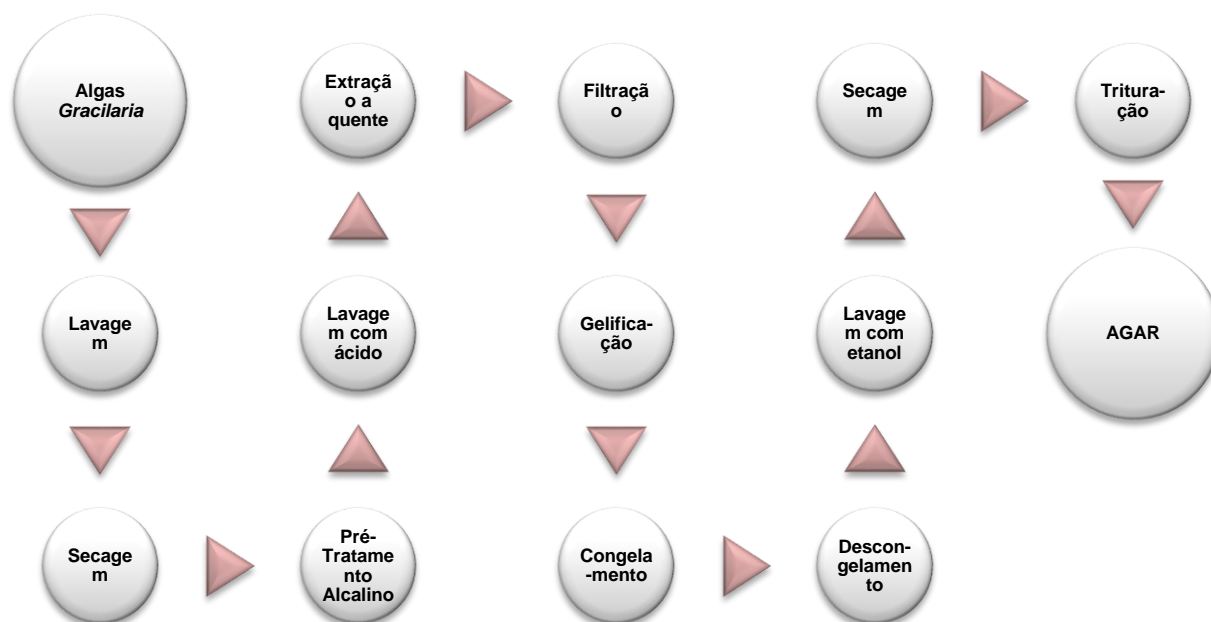
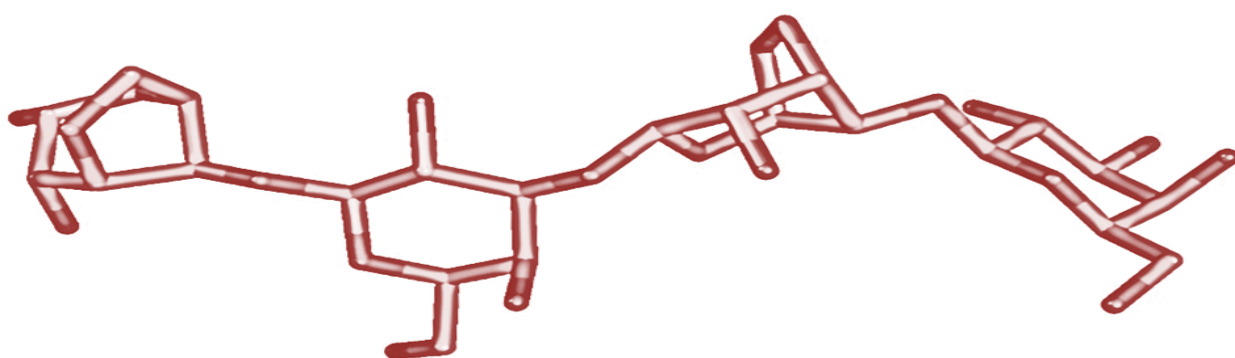


Figura 2-6 Esquematização do processo de extração de ágar das algas do género *Gracilaria*.



CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo inclui toda a parte experimental da presente dissertação, que teve lugar em ambiente laboratorial.

3.1. Instalação laboratorial e recursos utilizados

Toda a atividade experimental foi realizada no Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, no LEQ, Laboratório de Engenharia Química. De acordo com as pesquisas realizadas, foram então implementados certas metodologias e procedimentos experimentais para a realização da extração do ágar.

Na Tabela 3-1 e Tabela 3-2 encontram-se todos os recursos utilizados durante o processo de extração e qualificação do ágar obtido.

Tabela 3-1 Equipamentos necessários para a realização experimental

Equipamento	Marca
Espectrofotómetro	UNICAM - HEAIOSY
Micropipeta	AccuPet Pro 0,5-5mL
Placas de aquecimento	SBS-STIRRER
Estufa	Nahita – Model 631 Plus
Balanças de precisão	Mettler Toledo PB3002 e AG204
Medidor de pH	Metrohm 691PH-Meter
Termómetro	SUNDO
Placas de agitação	VWR VS-C7
Frigorífico	AEG-Electrolux
Moinho de café	BECKEN-Moligrano
Mufla	W.C. HERAEUS HANAU
Vortex	VWR

Capítulo 3

Tabela 3-2 Reagentes necessários para a realização experimental

Reagente	Fórmula Química	Marca/Laboratório	Grau de pureza mínimo (%)
Hidróxido de sódio	NaOH	Fisher Chemical	98,73
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Merck	95
Etanol absoluto	CH ₃ CH ₂ OH	Panreac	99,5
DH-Fructose	-	Matek	99
Gelatina microbiológica	-	Merck	-
Cloreto Férrico hexahidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	J.T.Baker	-
Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	Merck	99
Cloreto de bário	BaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	99
Ácido tricloroacético	CCl ₃ COOH	J.T.Baker	99
Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	Pronalab	99
Ácido Clorídrico	HCl	Fischer Chemical	37

3.1.1. Matéria-prima

As algas provinham da Ria de Aveiro (40° 38' 00" N; 84° 44' 00" W) (ver Figura 3-1-A) e constituíam material que era classificado como resíduo da indústria piscícola da região. No momento da apanha, no ano de 2013-14, as algas que apresentavam uma tonalidade encarnada, foram limpas de outros materiais estranhos e sujeitas a uma primeira lavagem com água abundante (Figura 3-1-B). A amostra foi depois transportada para o laboratório onde foi novamente lavada com água da rede e posteriormente seca ao ar livre e ao abrigo da luz solar (Figura 3-1-C).

Antes de serem usadas nas experiências, procedeu-se novamente à sua lavagem com bastante água da rede para retirar os resíduos que se encontravam entre as algas.



Figura 3-1 Vista aérea da piscicultura da Ria de Aveiro, local da recolha das algas *Gracilaria* utilizadas nesta dissertação (40° 38' 00" N; 84° 44' 00" W); B) Biomassa após a colheita para lavagem com água e remoção de materiais estranhos; C) Aspeto seco da *Gracilaria*

Nos primeiros ensaios de extração realizados, usou-se uma massa de algas de, aproximadamente, 400 g (peso húmido). No entanto, rapidamente ao longo das experiências



Figura 3-2 Algas da primeira extração após filtração do agar.

realizadas, foram detetados diversos problemas que iam surgindo pela quantidade excessiva de matéria-prima. Um dos problemas foi verificado no processo de filtração, após a extração do agar, uma vez que, como a quantidade de algas a ser filtrada era grande, parte do agar extraído ficava retido nas mesmas, o que pode ser observado na Figura 3-2. Deste modo, e tentando ultrapassar este problema, diversos ensaios foram realizados com diferentes massas

iniciais de algas até se encontrar uma quantidade que permitisse a realização da extração e do processo de filtração em boas condições. Assim sendo, as últimas extrações foram realizadas com uma massa de algas que variou entre 25 e 50 g (peso húmido). Note-se que, independentemente da quantidade de algas utilizada, sempre foi respeitada a proporção entre as quantidades de reagentes a usar e a massa de algas.

3.2. Pré-tratamento

As algas depois de lavadas foram submetidas a um pré-tratamento (PT) alcalino de forma a que a extração do agar seja facilitada.

Arvizu-Higuera e os seus coautores (2007) relatam no seu trabalho a importância do pré-tratamento na extração de agar de algas da espécie *Gracilaria*. Para avaliar, então, o efeito do pré-tratamento alcalino na extração do agar, foram realizadas previamente algumas extrações sem qualquer tipo de pré-tratamento. Assim, as algas foram apenas colocadas em água da rede durante meia hora com vista a poderem hidratar um pouco antes da extração.

Como da revisão bibliográfica efetuada sabia-se da necessidade de existir um pré tratamento alcalino, procedeu-se a alguns ensaios com vista à sua otimização, para que apresentasse um melhor rendimento na extração.

O procedimento inicial usado para a implementação do pré-tratamento baseou-se no trabalho de (Shuji Doi, et al., 1975). Usou-se uma amostra de 200 g de algas previamente lavadas com água da rede, que depois foram submetidas a um pré-tratamento em meio alcalino, usando uma solução aquosa de NaOH a 6% (w/w). As algas foram deixadas imersas na solução de NaOH e aí permaneceram durante 7 dias.

Após estes 7 dias, procedeu-se à neutralização das algas com a adição de uma solução aquosa de H_2SO_4 0,1M. Pensava-se ser este o método mais eficiente para promover a neutralização da mistura resultante do pré-tratamento. No entanto, com as consecutivas extrações, verificou-se que um dos passos fundamentais em todo o processo para se obter um elevado rendimento nas extrações seria o passo de neutralização. Assim sendo, realizou-se também um ensaio em que foi modificado o processo de neutralização e avaliada a maneira como este influenciava o rendimento da extração. Este ensaio é apresentado mais a frente.

Note-se ainda que, assim que as algas eram colocadas em meio básico, a sua tonalidade tornava-se esverdeada e soltavam um odor marinho. A Figura 3-3 apresenta uma imagem com algas durante o pré-tratamento, onde se pode observar a mudança de cor para um tom esverdeado.



Figura 3-3 Algas durante o pré tratamento em meio alcalino.

Relativamente ao tempo de pré-tratamento utilizado nos ensaios laboratoriais efetuados, este também foi variado com vista a obter um processo otimizado.

3.2.1.1. Otimização das condições do pré-tratamento

Com vista à otimização do pré-tratamento a utilizar nas extrações, foram realizados ensaios com soluções de NaOH com diversas concentrações e tempos diferentes de pré-tratamento.

O primeiro parâmetro de operação avaliado foi o da concentração da solução de NaOH usada no pré-tratamento. Assim, foram colocadas as algas num banho com soluções de NaOH com diferentes concentrações durante o mesmo tempo. Após esse tempo de pré tratamento, as algas seriam lavadas e passar-se-ia ao processo de neutralização das mesmas com vista à

realização das respectivas extrações. Depois de calculado o respetivo rendimento de cada extração, saber-se-ia a concentração da solução de NaOH usada no pré-tratamento que melhor se adequava à extração do ágar. Posteriormente, será descrita a forma de calcular o rendimento da extração de ágar das algas.

3.2.1.2. Neutralização

Inicialmente, segundo o procedimento experimental adotado, o processo de neutralização era realizado da seguinte maneira: depois das algas pré-tratadas em meio alcalino serem lavadas com água da rede em bastante abundância, as mesmas eram imersas em água, com um volume igual ao da solução usada no pré tratamento. Depois, adicionava-se pequenos volumes de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,1M e recorrendo a um medidor de pH procedia-se à medição do pH da solução, tentando sempre homogeneizar a solução agitando a mistura. Quando o valor de pH se aproximava de um pH neutro, as algas eram deixadas durante, sensivelmente, 15 minutos em repouso com vista a garantir a sua neutralização e que o valor de pH se mantinha estável. Assim que se verificasse que o pH se mantinha aproximadamente constante, procedia-se a uma nova lavagem das algas pré-tratadas e

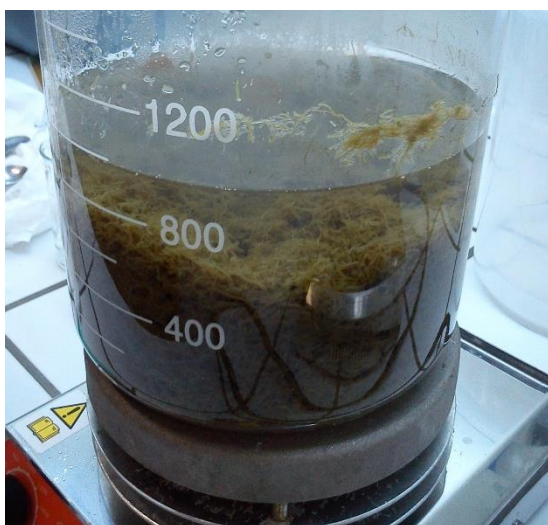


Figura 3-4 Exemplo de uma extração recorrendo previamente a um choque ácido numa solução aquosa de H_2SO_4 0,1M durante 15 minutos.

neutralizadas e, posteriormente, à sua extração. No entanto, com o decorrer das experiências realizadas, foi-se reparando que um dos fatores decisivos do processo era a etapa de neutralização das algas pré-tratadas.

Ao usar o procedimento descrito para neutralizar as algas verificou-se que as algas que ficavam diretamente em contacto com a solução de ácido adicionada, antes de se promover a uniformização da mistura com a agitação, apresentavam uma aparência de “queimadas”.

Posto isto, não era garantido que as algas fossem adequadamente neutralizadas e que se

encontrassem todas ao mesmo pH. De maneira a contornar esta situação, foi realizada uma alteração nesta parte experimental, e a etapa de neutralização começou a ser realizada recorrendo à imersão das algas pré-tratadas em meio alcalino num banho de uma solução ácida bastante menos concentrada. Deste modo, conseguia-se garantir uma maior uniformização das condições a que as algas ficavam sujeitas durante a neutralização. Assim, as algas passaram a ser imersas num banho de uma solução aquosa de H_2SO_4 0,03M durante

15 minutos e os rendimentos obtidos para as extrações de ágar das algas foram bastante superiores aos até então alcançados.

Ora, como com este procedimento de neutralização das algas foi obtido um rendimento bastante satisfatório, as restantes extrações foram realizadas com desta forma. De salientar que todas as neutralizações foram realizadas usando uma relação entre a massa de algas a neutralizar e o volume de solução de ácido de $\frac{1}{20}$ (w/v) e que o pH antes de cada extração foi sempre medido para garantir que o seu valor era próximo de 7.

Em alguns ensaios, procedeu-se também a um choque ácido, após o pré-tratamento e antes da extração tal como é sugerido por Santos (2011). Na Figura 3-4 pode verificar-se que as algas após a adição do ácido apresentavam uma cor como se estivessem “queimadas” e, após a extração do ágar quando se procedeu à filtração, verificou-se que o mesmo não gelificava, apresentando uma consistência pouco espessa.



Figura 3-5 Solução recuperada de uma extração de ágar após um pré-tratamento com um choque ácido.

A imagem seguinte apresenta o resultado descrito, sendo de notar que a solução apresentada já se encontrava à temperatura ambiente, pelo que já deveria estar gelificada.

.

3.3. Extração

Depois de se neutralizar as algas provenientes do pré-tratamento em meio alcalino estas eram submetidas ao processo de extração para remoção do ágar. Com vista à otimização das condições desta nova fase foi avaliado o efeito da duração do processo no seu rendimento.

3.3.1. Tempo de extração

Com base nos tempos de extração encontrados em diversos trabalhos durante a pesquisa bibliográfica, as extrações decorreram, na sua maioria, durante duas horas e trinta minutos.

A extração foi realizada à temperatura de cerca de 90°C, e durante o processo quer a temperatura quer o nível de água no extrator foram controlados. Inicialmente as extrações foram realizadas com amostras de 200 g de algas que foram imersas em 3 L de água para uma extração de duas horas e trinta minutos. (Shuji Doi, et al., 1975).

Uma imagem recolhida durante o primeiro ensaio de extração realizado, está apresentada na Figura 3-6, onde não foi repostada a água perdida por evaporação durante o processo. Como é visível na figura anterior, as algas a serem extraídas agarravam-se às paredes do extrator.



Figura 3-6 Primeira extração realizada.

Assim, as perdas de água por evaporação durante o processo passaram a ser compensadas com a adição de água de forma que o nível da água no extrator se mantivesse, aproximadamente, constante.

Quando no processo de filtração se verificou que as algas filtradas ainda se apresentavam com bastante ágar retido (pois apresentavam-se como uma pasta bastante espessa), voltaram a ser colocadas em água à temperatura de extração (cerca de 90 °C) de maneira a tentar retirar a máxima quantidade de ágar possível. Na grande maioria dos casos trinta minutos revelou-se suficiente para esta segunda da extração, uma vez que mais do que isso, não traria quaisquer vantagens em termos de quantidade de ágar obtido.

Deste modo, e com base nos resultados obtidos, verificou-se que o tempo de extração ótimo seria de duas horas e trinta minutos, sendo que, em quantidades significativas de algas a serem extraídas, a meia hora de extração suplementar, era fundamental para poder retirar o máximo de ágar presente nas algas.

Mais tarde, depois de otimizado o processo de extração, verificou-se que não era benéfico

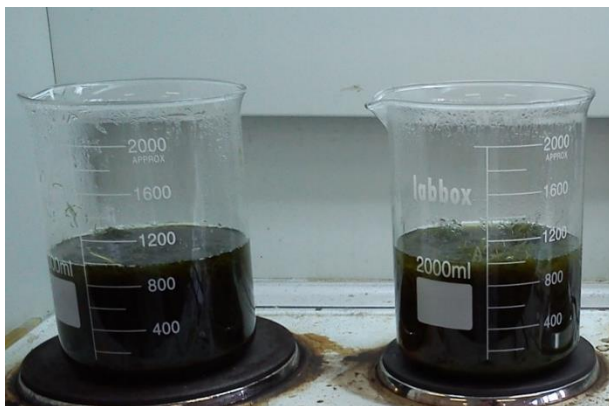


Figura 3-7 Extrações de ágar realizadas em copos de vidro com uma capacidade de 2 L.

usar uma quantidade de matéria-prima tão grande de uma só vez, e, assim sendo, o tempo de extração de duas horas e meia revelou-se adequado, usando uma quantidade de algas entre 25 e 50g. Assim, passou-se a usar uma quantidade inicial de algas mais pequena, o que podia facilitar a implementação do processo de extração. Deste modo, e comprovando-se que os resultados finais (a percentagem de ágar

extraído) não eram afetados, as extrações seguintes foram realizadas com quantidades de matéria-prima bastante menores e em copos de 2 L (ver Figura 3-7). Note-se que a relação entre a massa de algas e o volume de água usada na extração foi mantida constante.

Para se comprovar que esta espécie de algas continha ágar que podia ser extraído, fizeram-se uns testes visuais após se ter realizado a primeira extração, mesmo ainda sem as condições de extração otimizadas. Estes testes consistiram apenas em colocar uma amostra do líquido resultante da extração em copos com 10 mL de etanol. Caso a amostra precipitasse, indicaria a presença de ágar. Na Figura 3-8 é possível observar a precipitação do ágar em etanol.



Figura 3-8 Precipitação do Agar em etanol.

Este ensaio foi realizado apenas no início para ter a certeza de que na espécie de algas em questão, havia de facto ágar que podia ser extraído, pois este ensaio seria responsável por uma alteração da massa de ágar efetivamente extraída.

3.3.2. Filtração das algas e recuperação do ágar

Terminada a extração, as algas devem ser separadas da solução. No início, a filtração foi realizada usando uma rede metálica (ver Figura 3-9). No entanto, este processo não se revelou eficaz, pois verificou-se que as algas se apresentavam muito pastosas, indicando a presença de ágar, e que havia vestígios de algas na solução depois de filtrada. Posto isto, posteriormente, foram utilizados panos de algodão como meios de filtração, estes permitiram uma separação eficaz das algas e da solução com o ágar.



Figura 3-9 Filtração inicial em rede metálica

Depois de se deixar arrefecer a solução filtrada à temperatura ambiente, verificou-se, então, a gelificação do ágar. Deste modo, o próximo passo seria o congelamento e o respetivo descongelamento. O ágar foi colocado no congelador durante um dia para que pudesse acontecer o fenómeno de “*syneresis*” e depois descongelado à temperatura ambiente. Note-se que esta etapa é fundamental uma vez que é através do processo de congelamento/descongelamento que o ágar vai expulsar a água presente e ganhar a consistência necessária.

Posteriormente, este foi colocado num tabuleiro recoberto com uma película de acetato e seco numa estufa a 60°C. Depois de seco a quantidade de ágar extraída das algas foi pesada. A película de acetato usada para revestir o tabuleiro facilitava a remoção do ágar depois de seco na estufa a 60°C durante 24 horas (Ribeiro, 2011).

O fenómeno de *syneresis* é facilmente comprovado pelo aspeto do ágar antes do congelamento e depois do descongelamento. Antes de ser congelado, o ágar apresenta-se como se fosse gelatina consistente. Já após ser descongelado, o ágar expelle a água que possui ficando com um aspeto esponjoso. As figuras demonstram isto mesmo.

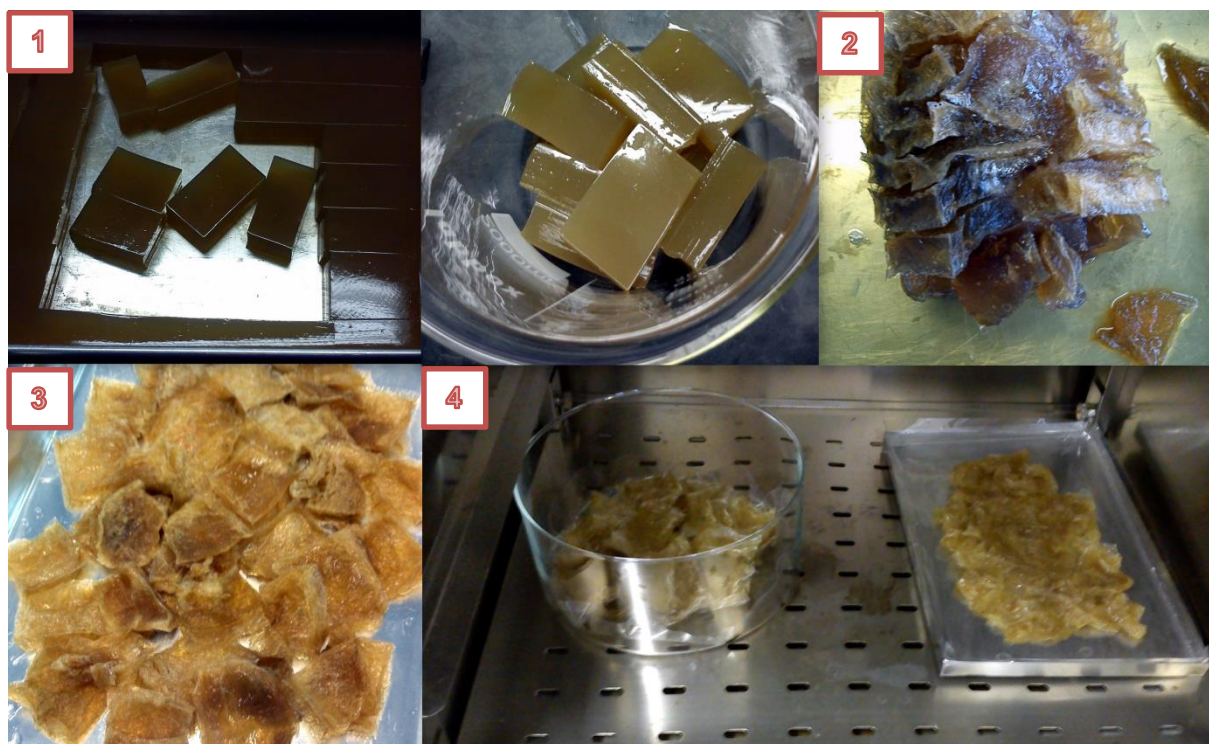


Figura 3-10 Imagens do ágar durante o processo de congelamento/descongelamento e secagem. 1 - ágar após a filtração que depois de atingir a temperatura de gelificação foi cortado aos pedaços para facilitar o seu armazenamento no congelador; 2 - descongelamento do ágar; 3 - ágar colocado sobre a película de acetato e pronto a ser seco na estufa a 60°C (4).

O ágar extraído possuía uma tonalidade acastanhada, tal como se pode verificar na Figura 3-10. Esta tonalidade é própria do ágar, no entanto, quando este é comercializado sofre um processo de lavagem que inclui etapas de lixiviação e purificação, apresentando no final uma tonalidade bastante mais clara. Depois de seco o ágar era moído de maneira a apresentar uma granulometria reduzida e guardado em frascos de vidro para as análises descritas posteriormente (ver Figura 3-11).



Figura 3-11 Amostra de ágar depois de seco na estufa.

3.3.3. Cálculo da humidade das algas

Para a obtenção do rendimento de cada extração, razão entre a massa de ágar extraído e a massa de algas utilizadas, como a matéria-prima não se encontrava completamente seca era necessário descontar a humidade presente nas algas usadas em cada ensaio de extração. Deste modo, por cada extração realizada, foi também feito um ensaio com uma pequena amostra de algas para determinação do seu teor de humidade.

Este ensaio consistiu simplesmente em recolher uma determinada massa conhecida de algas no dia da realização da extração para cadinhos e colocá-los numa estufa a uma temperatura de 100°C durante 24 horas. Após terem sido retiradas da estufa os cadinhos foram colocados num exsiccador e posteriormente foram pesados. A humidade das amostras foi, então, calculada a partir da seguinte equação,

$$\text{Humidade da amostra} = \frac{\text{massa inicial das algas} - \text{massa das algas secas}}{\text{massa das algas secas}} \times 100 \quad \text{eq.1)}$$

Note-se que estes ensaios foram sempre realizados em triplicado e também, a título de curiosidade e para se comprovar que realmente se tratava de matéria orgânica, todas as amostras após o processo de secagem e respetiva pesagem, foram à mufla a 500°C durante 15 minutos.

Tendo em conta sempre a humidade presente em cada amostra no dia da extração, tonou-se, então, possível calcular o rendimento de cada extração (w/w) de forma mais correta.

3.4. Avaliação da qualidade do ágar

Para avaliar a qualidade do ágar extraído, foram realizados testes físico-químicos que o pudessem comprovar. Relativamente aos testes físicos, estes basearam-se na determinação da força gel de cada amostra de ágar extraído. Já no que diz respeito à caracterização química do ágar seguiu-se a proposta pelo mercado internacional de ficocolóides, e foi quantificado o teor de sulfato e da 3,6-anidrogactose (Santos, 2011). Apesar de se poder encontrar ágar apresentado sobre diversas formas (Yoshimura, 2006), o que qualifica o ágar como sendo “bom”, ou não, para qualquer tipo de indústria são então os aspetos referidos anteriormente (R. D. Villanueva, 2009).

Deste modo, foram realizados todos os ensaios necessários para a avaliação da qualidade de todas as amostras de ágar extraídas. No entanto, em alguns ensaios realizados a

quantidade de ágar extraída não era suficiente para a realização de todos os parâmetros necessários para a avaliação da qualidade do ágar.

3.4.1. Cálculo do rendimento da extração

Tendo o parâmetro da humidade das algas usadas em cada extração sido calculado e sabendo a massa, tanto da amostra inicial de algas como também do ágar obtido em cada extração, facilmente se encontrou o rendimento da extração através da seguinte equação:

$$\text{Rendimento extração (w/w)} = \frac{\text{massa de ágar seco}}{\text{massa inicial das algas secas}} \times 100 \quad \text{eq.2)}$$

Este parâmetro foi então calculado através da equação anterior e no capítulo 4 serão apresentados os resultados dos rendimentos calculados para todas as extrações efetuadas.

3.4.2. Quantificação da força gel

O procedimento para a quantificação da força gel foi realizado segundo o descrito na bibliografia (Freile-Pelegrin, et al., 2004). Assim, como não havia instrumentação específica disponível, foi desenvolvido com a ajuda do Departamento de Engenharia Mecânica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra um equipamento que permitiu a medição deste parâmetro em cada amostra de gel do ágar extraído. Este equipamento consistia essencialmente num cilindro de plástico com a sua base fechada (apenas com um orifício de cerca de 1 cm²) e um varão metálico disposto coaxialmente (que servia de guia) onde foi acoplado na sua superfície inferior um cilindro com área de secção reta igual a 1 cm². O espaço livre entre o cilindro de plástico e o varão metálico era preenchido com pequenas porções de água que serviam para aumentar a força exercida pelo cilindro acoplado na base do sistema. Na Figura 3-12 encontra-se uma imagem durante um ensaio para determinação da força gel de uma amostra com o equipamento construído. Os ensaios foram realizados em triplicado sempre que existia a quantidade de gel do ágar extraído necessária para os ensaios mecânicos, quando tal não acontecia foi apenas realizado um ensaio. Desta forma, conseguia-se ter uma ideia da força gel de cada amostra de gel do ágar e também realizar os restantes ensaios físico-químicos que permitiam avaliar a sua qualidade.

Capítulo 3

Foram, então, preparadas soluções de ágar 1,5% (w/w) em 50 mL de água destilada (R. D. Villanueva, 2009). Depois de se deixarem gelificar à temperatura ambiente, foram colocadas no frigorífico durante, aproximadamente, 24 horas para que se desenvolvesse bem a consistência do gel. No dia seguinte, depois da solução gelificada, deixou-se atingir a temperatura ambiente e foi realizado o ensaio da força gel relativo a cada amostra de ágar. Utilizou-se o equipamento mencionado anteriormente, e apresentado na Figura 3-12, movimentando o varão interno até que a superfície inferior do cilindro acoplado ficasse tangente à superfície do gel da amostra que se encontrava num copo de vidro de 200 mL. Depois disso, em intervalos regulares de 20 segundos, era colocado um peso adicional sobre o cilindro em contacto com a superfície do gel, adicionando 20 mL de água. Quando o cilindro com 1 cm² perfurasse o gel, sabia-se o volume total de água adicionada no espaço anular do equipamento e, portanto, o peso suportado por cada amostra, que permite obter a sua força gel.

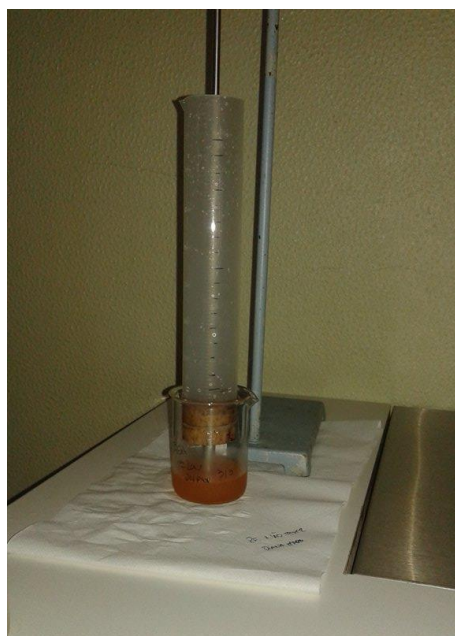


Figura 3-12 Imagem recolhida durante um ensaio de força gel.

O ágar para ser classificado como sendo um “bom ágar” terá de ter uma força-gel que varie entre 700 g/ cm² e 1100 g/ cm² (Santos, 2011).

3.4.3. Quantificação de 3,6-anidrogallactose

A fração de 3,6-anidrogallactose existente no ágar desempenha um papel fundamental na regulação da conformação helicoidal no polissacarídeo, influenciando diretamente a sua capacidade de gelificar.

Os tratamentos químicos utilizados durante os procedimentos de extração modificam as cadeias dos polissacarídeos constituintes do ágar conferindo uma melhor qualidade nas suas propriedades, como sendo a força do gel, e, conseqüentemente, o aumento do teor de 3,6-anidrogactose, para além de facilitarem a extração do mesmo e remover algumas proteínas e pigmentos. Segundo Villanueva (2009), as condições de extração devem ser testadas tendo-se em consideração a temperatura, concentração do álcali ou do ácido. O tempo de extração também é específico para cada espécie de algas usadas (McHugh, 2003).

As análises do teor em 3,6-anidrogactose no ágar obtido das extrações realizadas foram feitas através do método colorimétrico adaptado do trabalho proposto por Matushiro, (1995). Esse método tem como princípio colocar o composto que se deseja quantificar em contato com um reagente específico, de modo a que essa mistura desenvolva uma coloração, e que a sua intensidade seja proporcional à concentração da substância, que, neste caso específico, será o 3,6-anidrogactose. As análises a esta substância, foram realizadas nas amostras de todas as extrações feitas, sendo a sua quantificação realizada recorrendo a um espectrofotómetro UV-visível para a leitura da absorvância das soluções a um comprimento de onda de 635 nm. Para determinar a quantidade de 3,6-anidrogactose foi necessário recorrer a uma curva de calibração obtida previamente com soluções padrão de D-frutose.

3.4.3.1. Preparação das amostras de ágar para análise de 3,6-anidrogactose

Como as amostras de ágar eram sólidas, foi necessário proceder à sua dissolução. Para tal, pesaram-se amostras de, aproximadamente, 10 mg de ágar em tubos de Falcon de 50 mL. De seguida, adicionou-se 40 mL de água destilada e os tubos foram imersos num banho-maria, a uma temperatura de cerca de 90 °C, durante aproximadamente duas horas, até que ocorresse a dissolução completa do ágar. Posteriormente, adicionou-se mais água destilada até perfazer um volume de 50 mL. Estava, assim, terminada a preparação da amostra para a análise do teor em 3,6-anidrogactose.

3.4.3.2. Procedimento experimental para a quantificação de 3,6-anidrogactose

Depois de preparadas as soluções com todas as amostras de ágar a serem analisadas, usando o procedimento descrito na secção anterior, procedeu-se à quantificação de 3,6-anidrogactose. Para isso, em tubos de ensaio de 30 mL com rolha, foram adicionados 2 mL de água destilada, 0,5 mL de uma solução de timol a 5% (w/v) em etanol, 5 mL de cloreto férrico 0,5% (w/w) em HCl concentrado e, ainda, 2 mL de cada solução a analisar (quer esta

fosse de ágar, de água destilada para a obtenção do “branco” ou, inicialmente, das soluções diluídas de D-frutose para a obtenção da curva de calibração).

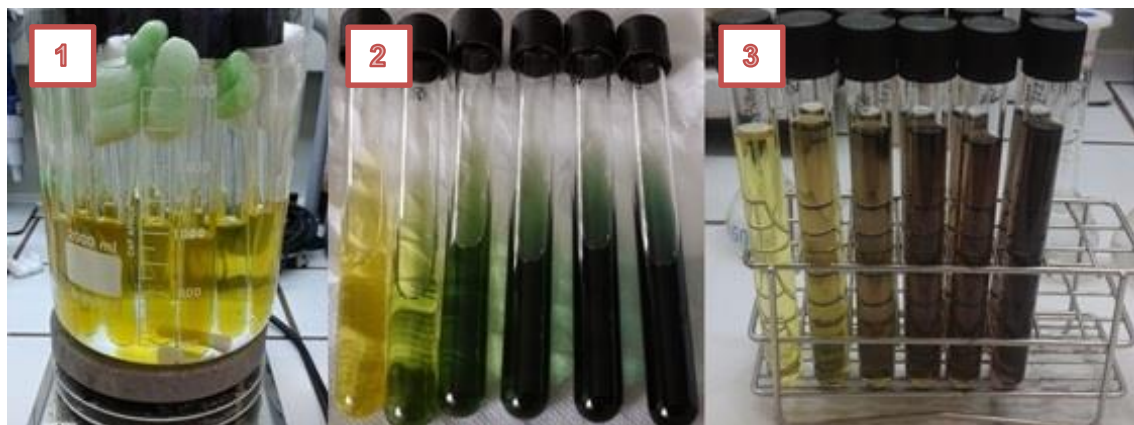


Figura 3-13 Amostras das soluções de D-frutose para obtenção da curva de calibração para a quantificação de 3,6-anidrogallactose: 1) Banho-maria com as amostras para a análise do teor de 3,6-anidrogallactose. 2) Depois de removidos do banho termoestabilizado a 80°C, é visível a diferença de tonalidade das misturas que correspondem a diferentes teores de 3,6-anidrogallactose. 3) Após a adição de 10 mL de etanol verifica-se uma mudança de tonalidade.

Agitou-se tudo com auxílio de um Vortex e os tubos com a mistura (com um volume total igual a 9,5 mL) foram imersos num banho termo-estabilizado a 80 °C, durante 15 minutos. Depois os tubos de ensaio foram colocados num banho com gelo e após se ter verificado a diminuição da temperatura, foram adicionados 10 mL de etanol a 98%. Verificou-se que a tonalidade de cada solução variou um pouco aquando da adição do etanol.

Na Figura 3-13, pode observar-se que quando os tubos que contém o ágar se encontram no banho-maria, todos eles apresentam a mesma cor. Com o aquecimento da mistura, promove-se a reação e vai sendo possível a nível visual constatar a presença da 3,6-anidrogallactose, uma vez as misturas vão desenvolvendo uma tonalidade esverdeada. É de salientar que todas as análises de 3,6-anidrogallactose foram realizadas em triplicado para cada amostra de ágar.

Após este procedimento, todas as amostras foram agitadas novamente e procedeu-se à leitura das respetivas absorvâncias, a 635 nm, no espectrofotómetro.

Com o valor das absorvâncias de todas as amostras analisadas, a quantidade de 3,6-anidrogallactose foi calculada segundo a seguinte expressão:

$$\%3,6 - \text{anidrogallactose} = \frac{\text{Absorvância}}{\text{Declive da reta de calibração}} \times \frac{(50 \text{ mL}) \times 19,5 \text{ mL}}{\text{massa de agar } (\pm 10 \text{ mg}) \times 2 \text{ mL}} \times 100 \quad \text{eq.4)}$$

3.4.3.3. Obtenção da curva de calibração com D-frutose

A curva calibração foi construída a partir de uma solução mãe de frutose (Sigma). Dela, prepararam-se várias soluções padrão por diluição, de forma a obter soluções com

concentração em D-frutose a variar desde 0 até 0,055 mg/mL. Procedeu-se à leitura das absorvâncias de todas as soluções padrão preparadas a um comprimento de onda de 635 nm e aplicando o método de regressão linear foi possível obter a equação da reta que melhor se ajustava aos valores obtidos.

As concentrações de 3,6-anidrogactose nas amostras foram, então, calculadas recorrendo ao valor gerado através da inclinação da curva de calibração depois de lida a absorvância da mistura.

Para testar se a concentração da frutose na solução mãe preparada sofria alteração com o tempo de preparação da solução, foi preparada uma solução mãe de frutose que originou duas curvas calibração diferentes, realizadas com o espaçamento de 3 dias. Como para a curva de calibração obtida logo após a preparação da solução mãe os resultados obtidos não foram feitos em triplicado, guardou-se a solução mãe usada. Quando se repetiu o mesmo processo, passados 3 dias, registaram-se valores díspares dos obtidos inicialmente. Queria isto dizer que a solução mãe não mantinha as suas características, sendo, por isso, sensível ao tempo. Tal como se pode observar na Figura 3-14, a inclinação da curva de calibração diminuiu o seu valor quase para metade passados 3 dias e o coeficiente de correlação obtido é menor.

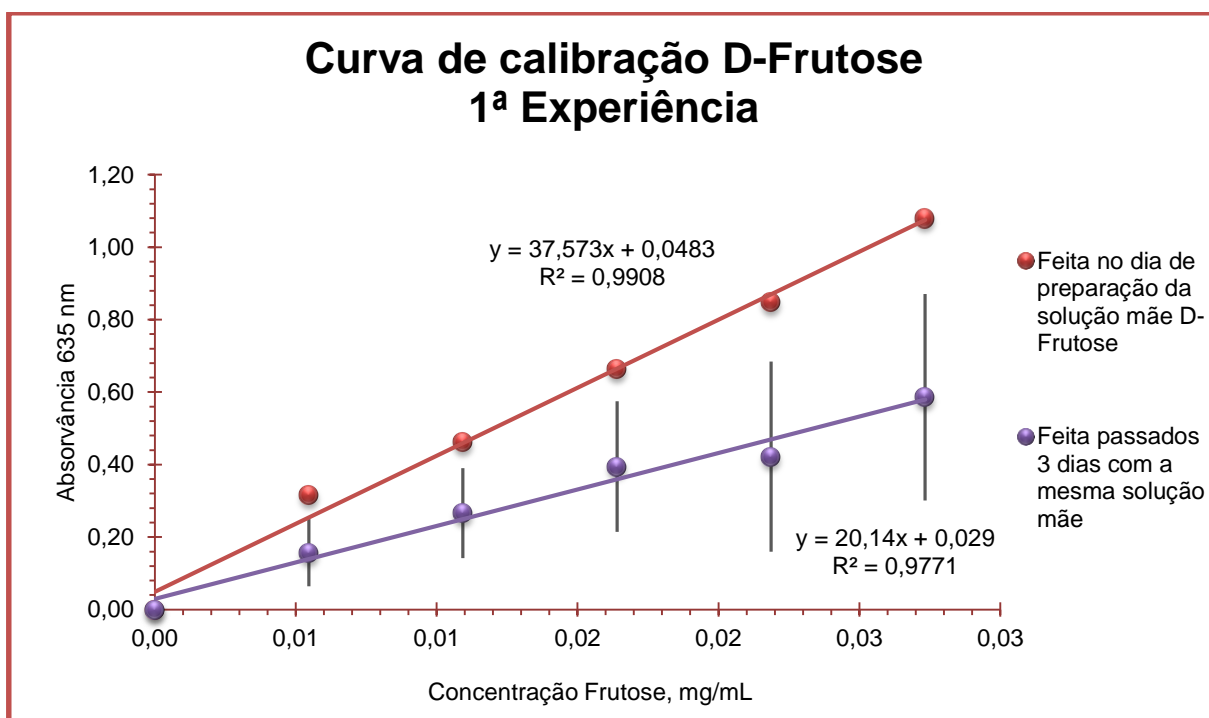


Figura 3-14 Primeira curva de calibração obtida para a D-frutose. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.

Para comprovar que efetivamente as soluções de frutose não se podiam ser armazenadas, mesmo no frio, realizou-se mais uma experiência que consistiu na repetição da primeira já mencionada e que deu origem às curvas de calibração representadas na Figura 3-15. Esta experiência já contou com a realização de amostras em triplicado para cada leitura de absorvância e o resultado está representado no gráfico da figura seguinte.

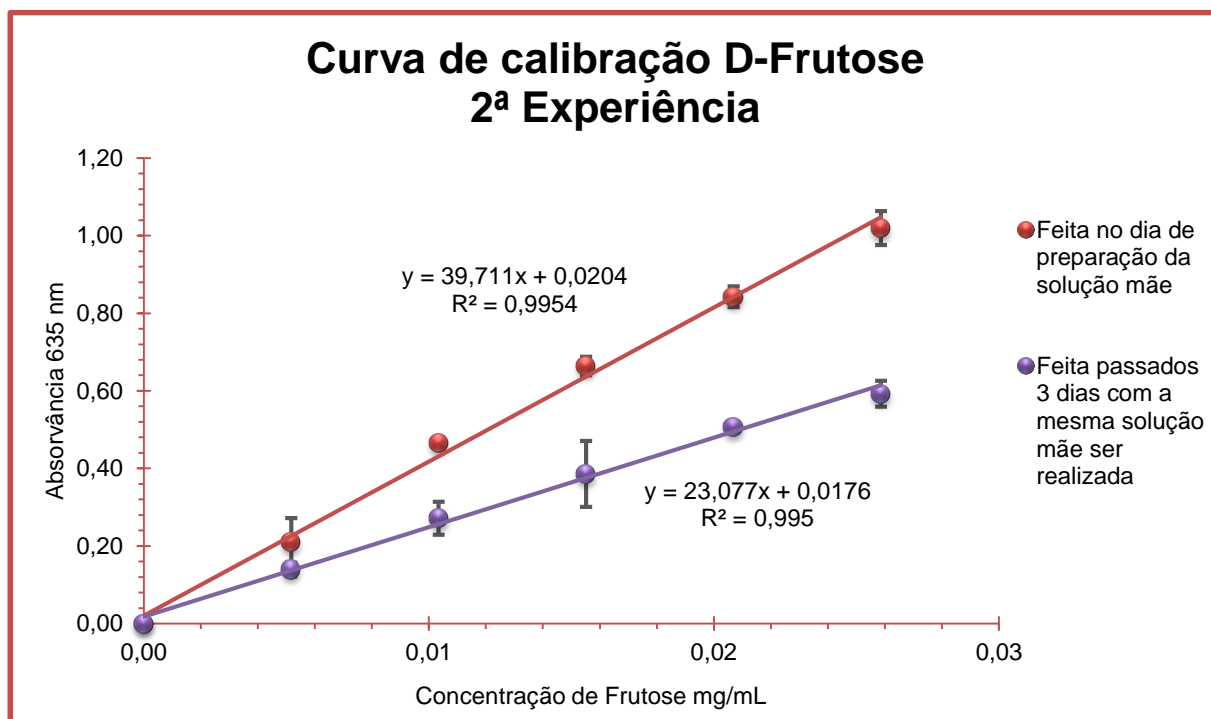


Figura 3-15 Repetição da curva de calibração obtida para a D-frutose. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.

Como é facilmente comprovado pelos resultados representados nas figuras anteriores, Figura 3-14 e Figura 3-15, a solução padrão de frutose é sensível face ao passar dos dias. Assim, tendo em conta as curvas de calibração anteriores que foram obtidas logo após a preparação da solução padrão mãe de frutose, foi obtida uma curva de calibração efetiva que permitiria a quantificação de 3,6-anidrogactose, que se encontra apresentada no gráfico da figura seguinte.

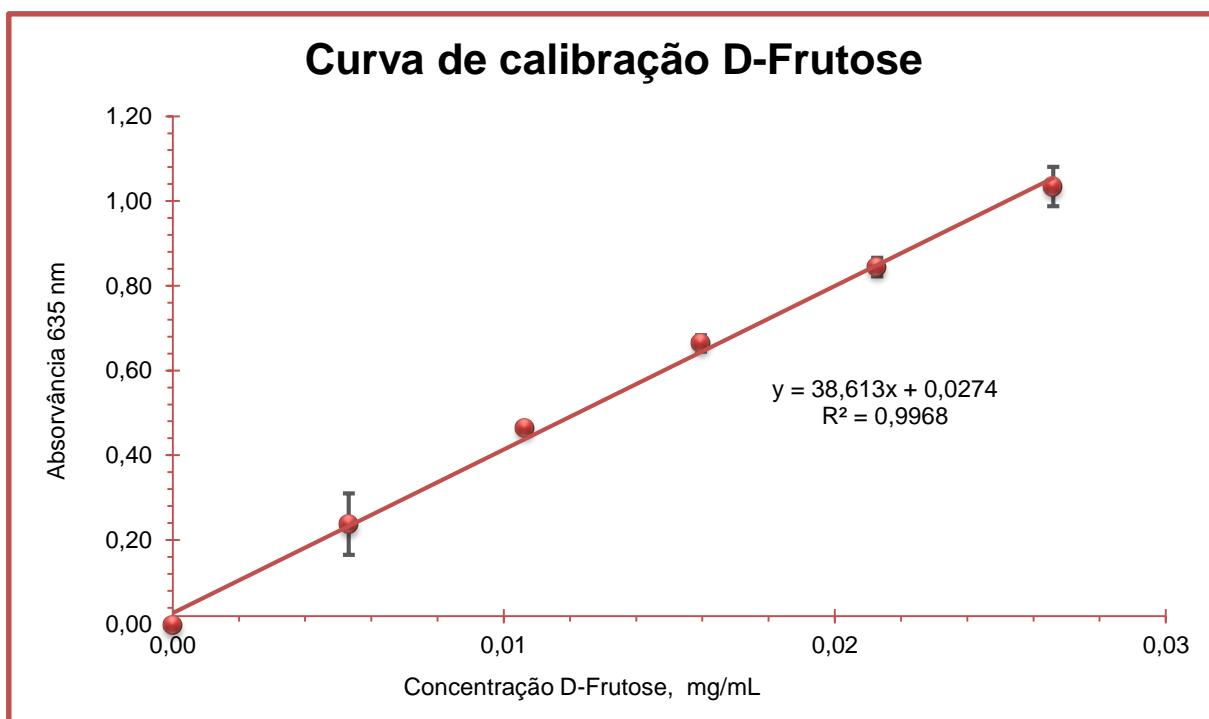


Figura 3-16 Curva de calibração efetiva para a D-frutose e que foi usada na quantificação de 3,6-anidrogactose. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.

Com base nas absorvâncias lidas para as soluções padrão de D-frutose preparadas, foi, então, possível obter a curva de calibração que viria a ser utilizada na quantificação de 3,6-anidrogactose, usando uma regressão linear, com a seguinte expressão:

$$\text{absorvância} = 38,613 \text{ concentração (mg/mL)} + 0,02734$$

eq.3)

$$r^2 = 0,9968$$

Note-se que, com base, tanto no valor relativamente pequeno da ordenada na origem e do coeficiente de correlação encontrado, a curva de calibração obtida apresenta características bastante satisfatórias.

Após a determinação da curva de calibração da D-frutose, passou-se, então, à quantificação de 3,6-anidrogactose presente em cada amostra de ágar extraído nas experiências realizadas. Para a quantificação de 3,6-anidrogactose, seguiu-se um procedimento experimental descrito por Santos (2011). Deste modo, tanto as amostras de ágar como as que foram preparadas com a frutose para a obtenção da curva de calibração, foram submetidas ao mesmo tratamento (Santos, 2011).

3.4.4. Quantificação de sulfato

Tal como foi referido anteriormente, o ágar comercializado é considerado de boa qualidade quando possuir um baixo teor de sulfato. A quantificação de sulfato na molécula de ágar fornece um dos parâmetros essenciais para avaliar a de qualidade deste ficocolóide, sendo que, quanto menor for o teor presente, maior a qualidade do gel (Santos, 2011).

O teor em sulfato dos extratos obtidos das experiências realizadas foi determinado pela técnica da precipitação do cloreto de bário, depois da hidrólise das amostras de ágar com uma solução aquosa de HCl 1M, a 100°C, durante duas horas. A determinação do teor de sulfato foi feita por espectrofotometria, através da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 550 nm recorrendo a um espectrofotómetro.

Tal como aconteceu para a quantificação de 3,6-anidrogactose, houve necessidade de se construir uma curva de calibração para a obtenção do teor de sulfato.

3.4.4.1. Preparação das amostras de ágar para análise do teor em sulfato

Tal como foi referido anteriormente, todas as amostras de ágar necessitaram de um tratamento previamente à análise espectrofotométrica. Segundo a bibliografia consultada pode-se recorrer a um procedimento que envolve a hidrólise do ágar. A hidrólise da amostra permite a libertação dos iões sulfato presentes no ágar que, após adição de cloreto de bário (BaCl_2), se ligam aos iões bário promovendo a precipitação do composto formado (Sousa, 2008). O procedimento para promover a reação de hidrólise teve de ser adaptado às condições existentes.

Para promover a hidrólise do ágar em cada amostra que iria ser analisada foi seguido o procedimento descrito por Santos (2011). Assim sendo, em tubos de ensaio de 5 mL, com tampa de rosca, foram colocados 12 mg de ágar sólido. Depois, adicionou-se 2 mL de ácido clorídrico (HCl) 1M e fecharam-se bem os tubos. Colocaram-se os tubos num banho-maria a 100°C durante duas horas, sendo devidamente agitados a cada 15 minutos. Após ter ocorrido a reação de hidrólise durante as duas horas, retiraram-se os tubos, sendo agitados uma última vez, e deixaram-se em repouso por meia hora, de maneira a que os resíduos sólidos existentes, sedimentassem. A hidrólise estava deste modo concluída e após este passo, poder-se-iam recolher os 200 µL de cada solução para a posterior leitura do teor de sulfato.

3.4.4.2. Procedimento experimental para a quantificação do teor de sulfato

Para a realização deste processo foi indispensável a realização de algumas soluções. Uma delas seria então a solução de cloreto de bário em gelatina, cujo modo de preparação está descrito na secção “Apêndices”

Deste modo, em tubos de 10 mL foram adicionados os 200 µL da solução após a hidrólise referida anteriormente, ou de água destilada (para a realização do branco), ou das diluições da solução mãe padrão para a curva de calibração do sulfato. A esta quantidade, foi adicionado, posteriormente, 3,8 mL de ácido tricloroacético 3% (w/w) e, finalmente, 1 mL de cloreto de bário em gelatina. Os tubos de ensaio foram devidamente agitados com o auxílio de um Vortex e deixados a repousar durante cerca de 20 minutos. Após este tempo de repouso, as respetivas absorvâncias foram lidas num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 550 nm. Todas as amostras foram lidas em triplicado. A partir das absorvâncias, a quantidade do teor de sulfato presente em cada amostra foi calculada a partir da curva de calibração apresentada na Figura 3-17. A seguinte equação apresenta o modo como foi calculado a percentagem relativa ao teor de sulfato presente em cada amostra.

$$\% \text{de sulfato (w/w)} = \frac{(\text{Absorvância} - \text{Ordenada na origem})}{\text{Declive da curva de calibração}} \times \frac{1000}{0,2 \text{ mL}} \times \frac{\text{massa molar do sulfato}}{\text{massa ágar } (\pm 12 \text{ mg})} \times 100 \quad \text{eq.6)}$$

3.4.4.3. Obtenção da curva de calibração para o sulfato

A curva de calibração para este método foi obtida a partir de soluções padrão preparadas, por diluição, de uma solução padrão mãe de sulfato de sódio (Na_2SO_4) 0,025 M. Desta, foram pipetados com o auxílio de uma micropipeta de 0,5 até 5 mL, os seguintes volumes para diferentes tubos de ensaio: 400 µL, 800 µL, 1200 µL, 1600 µL e 2000 µL. Posteriormente, completou-se o volume para os 2 mL com água destilada e agitaram-se todos os tubos recorrendo a um agitador tipo Vortex. Depois destas diluições preparadas a partir da solução mãe, apenas se teria de preparar a amostra para a análise espectrofotométrica, descrita anteriormente.

Assim, conseguiu-se obter a curva de calibração para o sulfato, que se encontra no gráfico da Figura 3-17, onde se apresenta a relação entre as absorvâncias das soluções padrão com a respetiva concentração em sulfato presente em cada solução.

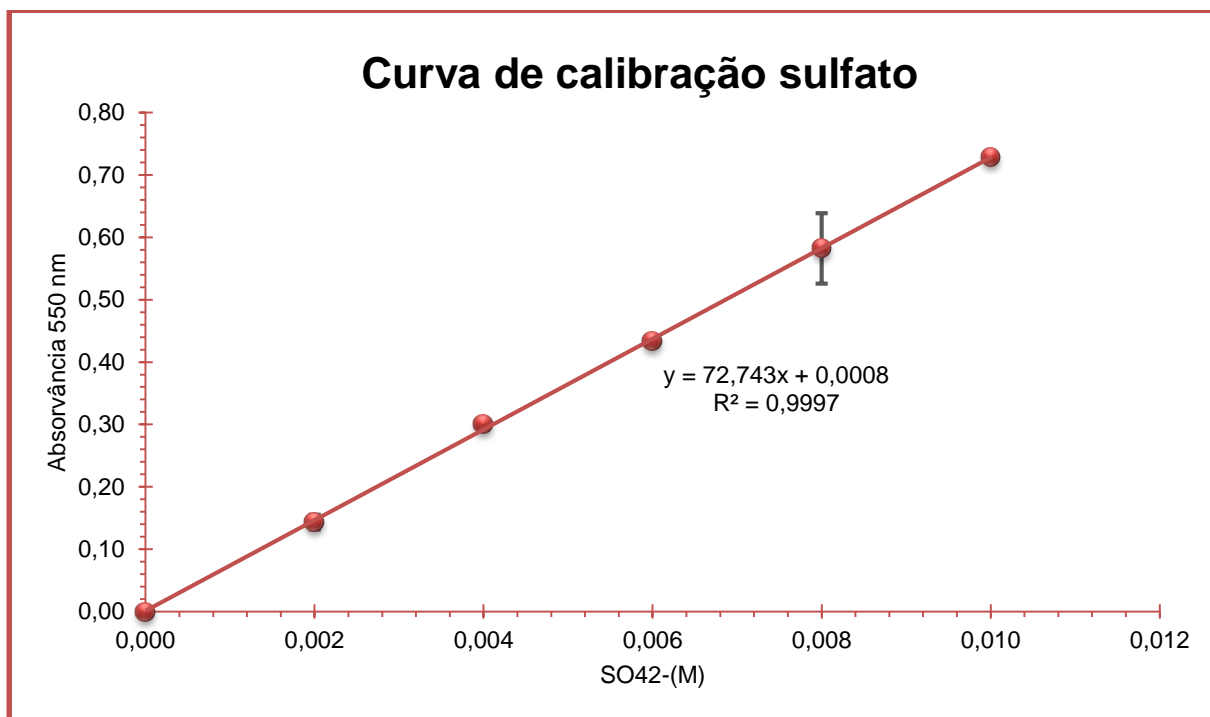


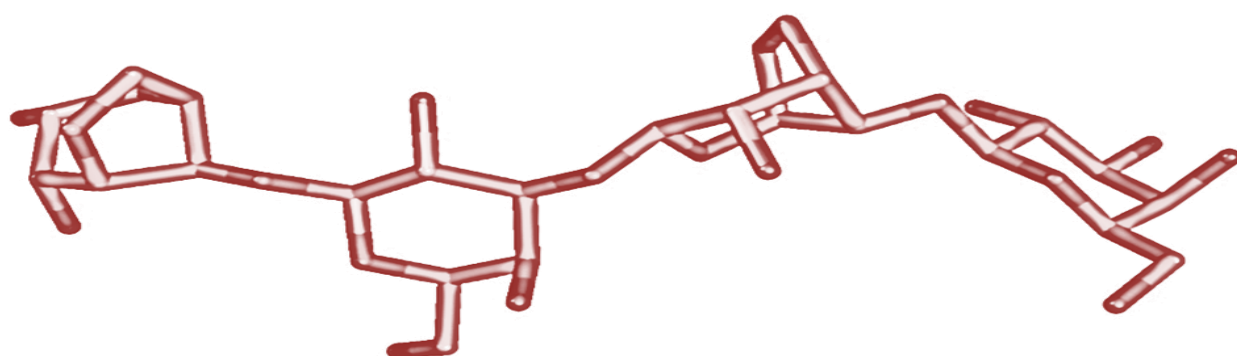
Figura 3-17 Curva de calibração obtida para o sulfato. As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das soluções padrão.

A equação da curva de calibração obtida pode ser traduzida pela seguinte expressão:

$$\text{absorvância} = 72,743 \times \text{concentração de sulfato (M)} + 0,0008 \quad \text{eq.5)}$$

$$r^2 = 0,9997$$

Tal como se pode observar, a regressão apresenta uma boa linearidade, uma vez que o respetivo coeficiente de correlação é de, aproximadamente, 1. Para além disso, e tal como esperado, o valor da ordenada na origem é um valor muito próximo de zero, o que comprova mais uma vez que a linearidade da expressão conseguida se enquadra nos objetivos propostos.



CAPÍTULO 4 – RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta todos os resultados experimentais obtidos no decorrer do desenvolvimento da presente dissertação. À medida que os resultados vão sendo apresentados, são também discutidos e apresentadas as principais conclusões.

Esta metodologia de apresentação dos resultados tem como principal intuito mostrar a evolução dos procedimentos até à otimização do processo para que, futuramente, este seja um ponto de partida para outros trabalhos.

4.1. Otimização das condições de operação da extração do ágar

Tal como foi descrito anteriormente, diversas foram as extrações realizadas com o objetivo de se tentar otimizar as condições a usar. Deste modo, e sabendo que o pré-tratamento era essencial para melhorar o rendimento de ágar extraído, foram modificadas certas condições de maneira a otimizar o processo de extração.

Assim, inicialmente, foram realizadas experiências com o objetivo de avaliar o impacto do tempo do pré-tratamento (PT) e da concentração da solução de NaOH usada no processo de extração.

Na tabela seguinte, são apresentados os rendimentos obtidos para cada extração realizada, assim como as condições usadas no pré-tratamento. Para servir de comparação, na Tabela 4-1, são apresentados também os resultados de três ensaios em que as algas usadas na extração não foram submetidas a qualquer tipo de pré-tratamento. Embora se tivesse conseguido extrair alguma quantidade de ágar, esta não se revelou suficiente, comparando com o que se conseguiria obter nas outras extrações onde foi usado PT.

É de salientar o facto de, em algumas extrações, se ter verificado que, após a filtração do resultado da extração, as algas ainda possuíam bastante ágar, o que fez com que as mesmas fossem sujeitas a um novo processo extrativo. Neste segundo processo de extração, usou-se água e para o cálculo do rendimento do processo foi usada a quantidade de ágar obtida nas diversas fases de extração. Pelo facto de nas fases posteriores se usar água para remover o ágar que ficou retido nas algas provenientes do primeiro processo de extração, estas serão designadas por “lavagens”.

Capítulo 4

Tabela 4-1 Rendimento das extrações realizadas, sem e com pré-tratamento das algas, tendo-se modificado as condições do PT (concentração da solução alcalina e tempo), assim como a massa de matéria-prima e o tempo de extração.

Ensaio	Massa de algas (g)	Concentração NaOH no PT, w/w (%)	Tempo do PT (d)	Tempo de extração (h)	Massa de agar extraída (g)	Rendimento (%)
1	22,46	-	-	2,50	0,61	2,73
2	21,53	-	-	2,50	0,43	1,98
3	24,93	-	-	2,50	0,51	2,06
4	240,98	6	1	3,00	15,95	6,62
5	263,57	6	4	2,50	17,96	6,81
6	169,53	6	6	2,50	15,69	9,25
7	167,38	6	8	2,00	23,23	13,88
8	166,81	6	12	2,00	34,01	20,39
9	169,71	6	8	2,50	13,58	11,71
10*					6,29	
11	21,66	6	5	3,00	1,25	8,23
12*					0,53	
13	20,30	6	5	3,00	0,51	4,95
14*					0,49	
15	22,85	6	5	3,00	0,53	9,76
16*					1,35	
17*					0,35	
18	22,86	6	9	3,00	2,58	14,68
19*					0,77	
20	24,00	6	9	3,00	2,80	15,36
21*					0,89	
22	22,36	6	9	3,00	2,45	14,55
23*					0,80	
24	22,22	6	9	3,00	0,69	12,45
25*					2,07	
26	176,25	6	9	3,50	11,27	11,20
27*					5,00	
28*					3,47	
29	168,35	10	8	2,50	7,38	5,73
30*					2,26	
31	389,69	14	8	2,50	15,18	3,83
32	168,18	14	8	2,50	8,48	7,15
33*					3,54	

* Nova extração realizada com as algas resultantes da extração anterior (lavagem).

Tal como seria de prever, pode ser observado da tabela anterior que o rendimento das extrações realizadas usando como matéria-prima as algas sem pré-tratamento é sempre inferior ao obtido com algas submetidas a um pré-tratamento com uma solução alcalina. Estas experiências servirão como referência para avaliar o impacto do pré-tratamento e da otimização das suas condições. A variação do rendimento da extração para as experiências realizadas em condições semelhantes é significativa (1,97% até 20,39%), o que pode indiciar

a dificuldade em reproduzir os procedimentos e as condições durante o processo de extração, assim como, a não uniformização das características da matéria-prima.

Como se pode observar da Tabela 4-1, foram realizadas experiências em que se modificaram alguns parâmetros do processo, tais como, a quantidade de matéria-prima, a concentração da solução alcalina usada no PT o tempo do PT e o tempo de extração. Estas experiências foram realizadas com o objetivo de otimizar as condições a usar no processo de extração do ágar das algas, tal como já foi referido. Assim, nas próximas secções serão apresentadas algumas representações gráficas onde se agruparam experiências em que se modificou um dos parâmetros para facilitar a discussão e apurar qual a melhor opção a utilizar para que o processo seja otimizado.

4.1.1. Massa de algas usada na extração

A primeira variável que foi tida em conta foi a quantidade de algas a ser usada nas extrações. Tal como foi já referido no capítulo 3, a massa de algas usada nas experiências de extração começou por apresentar valores entre 200 e 300 g, mas com o decorrer do tempo, verificou-se que a operacionalização do processo era favorecida se a massa fosse mais reduzida. Se as características da matéria-prima fossem uniformes, mantendo as proporções entre o volume de solução alcalina do PT, assim como, o volume de água na extração, e a massa de algas usada nas experiências esperava-se que este parâmetro não influenciasse o rendimento das extrações.

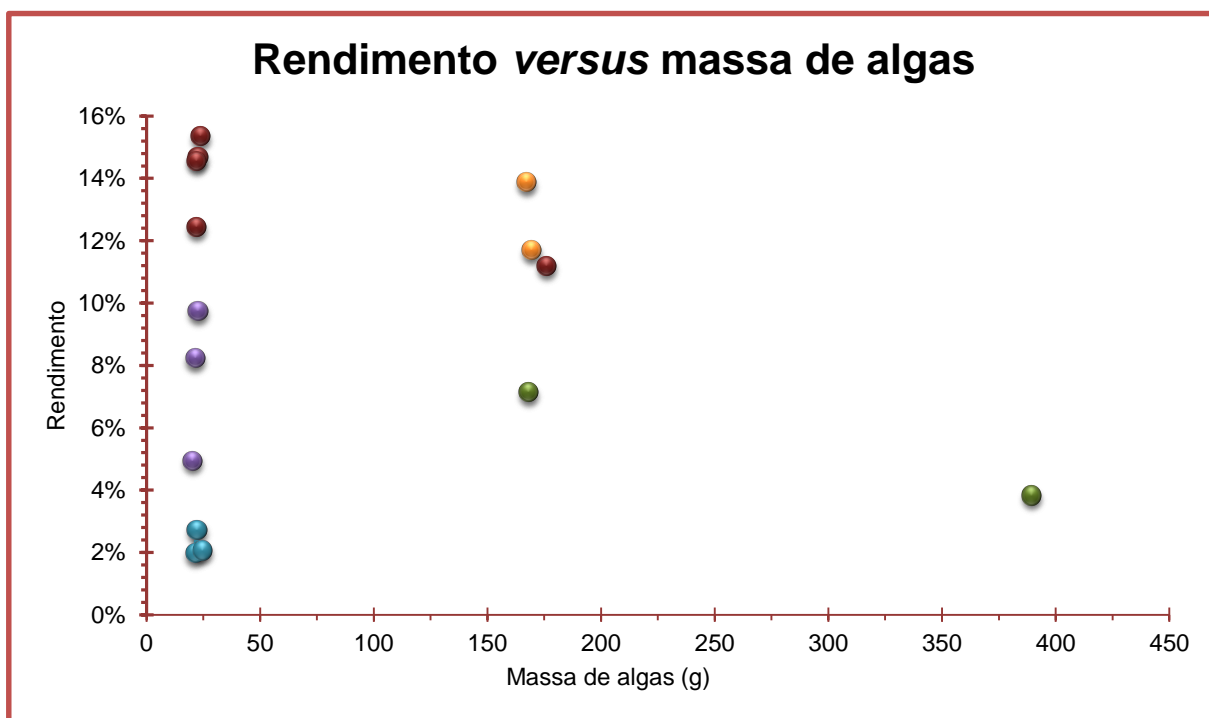


Figura 4-1 Rendimento da extração para grupos de experiências em que se variou a massa de algas usada. [PT] significa concentração de NaOH no pré-tratamento e T diz respeito aos dias de pré-tratamento de cada ensaio.

Na Figura 4-1 estão representados os rendimentos obtidos para a extração do ágar em cinco grupos de experiências em que se modificaram as condições do PT das algas. Em dois desses grupos, usaram-se massas iniciais de algas significativamente diferentes. Nos três grupos restantes de experiências em que a massa de matéria-prima foi aproximadamente a mesma permite concluir quanto à reprodutibilidade dos ensaios. Assim, pode observar-se da figura que a dispersão que existe entre ensaios semelhantes realizados com aproximadamente a mesma massa de algas é bastante notória, o que evidencia, mais uma vez, a dificuldade em reproduzir o procedimento e/ou condições usados na extração, assim como, pode revelar a não uniformização das características da matéria-prima. Como a ordem de grandeza da diferença de rendimentos das experiências realizadas com massas de matéria-prima distintas (ver grupo de experiências indicadas com símbolos verdes e cor de tijolo na Figura 4-1) é da mesma ordem de grandeza da dispersão que existe entre ensaios realizados com massas semelhantes, em termos práticos, seria realmente mais vantajoso trabalhar-se com a menor quantidade de algas. Deste modo, as experiências de extração passaram a ser realizadas com uma massa de algas entre 25 e 30 g.

4.1.2. Efeito da concentração da solução alcalina e do tempo do pré-tratamento

De forma a verificar qual a concentração da solução alcalina e o tempo a usar durante o PT para que se obtivesse um maior rendimento na extração, foram realizados previamente alguns ensaios onde se alteraram individualmente estas variáveis.

4.1.2.1. Concentração de NaOH no pré-tratamento

Na figura seguinte, são apresentados alguns dos ensaios realizados para a otimização da concentração de NaOH relativa ao pré-tratamento a que as algas deveriam ser submetidas.

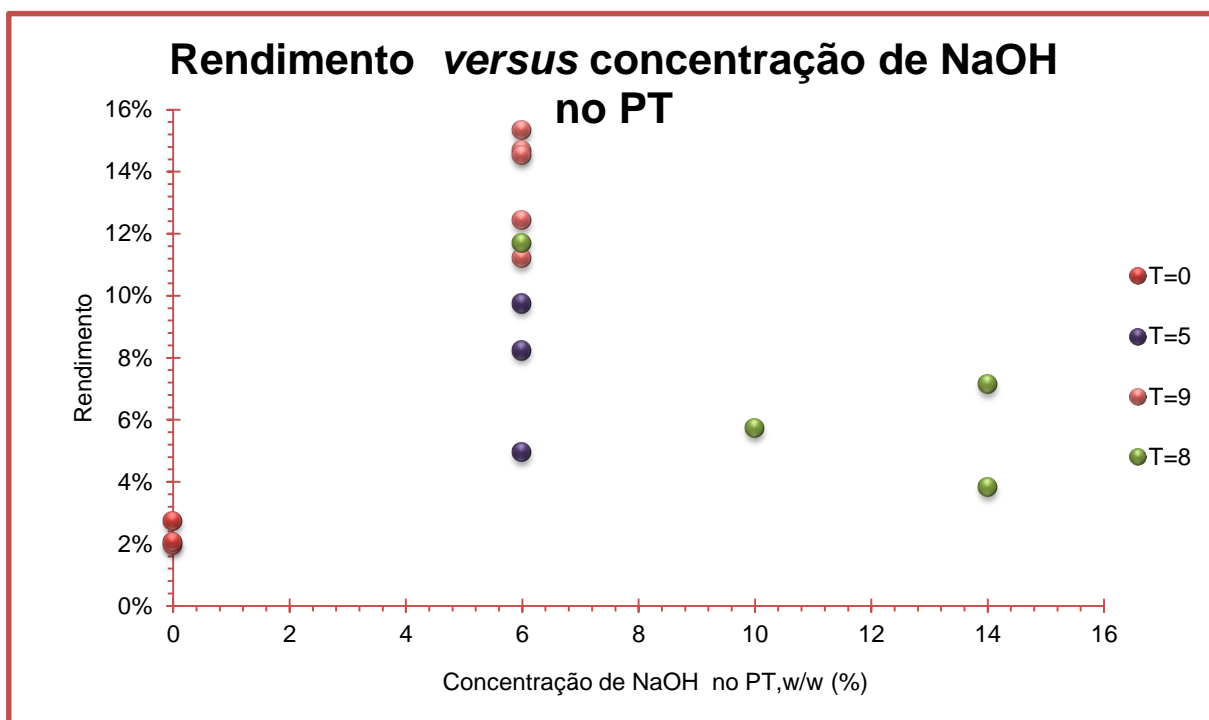


Figura 4-2 Rendimento da extração para grupos de experiências em que se variou a concentração de NaOH a usar no PT. T diz respeito aos dias de pré-tratamento de cada ensaio.

Com base na Figura 4-2, pode-se concluir facilmente que a concentração da solução alcalina usada no pré-tratamento das algas tem bastante efeito no rendimento da extração, uma vez que para os três primeiros ensaios realizados sem qualquer tipo de pré-tratamento, o rendimento das mesmas não ultrapassou os 2,5%, valor notoriamente mais baixo do que os obtidos nas extrações em que as algas foram previamente submetidas a um tratamento alcalino. Por outro lado, o grupo de ensaios representados com símbolos a verde na Figura 4-2, no qual se fez variar a concentração da solução alcalina do PT, para o mesmo tempo de pré-tratamento, mostram que quanto mais concentrada é a solução, pior é o rendimento obtido para a extração do ágar. Para comprovar esta conclusão, foram realizados mais ensaios usando uma concentração de 6% de NaOH (w/w) para a solução alcalina no PT, modificando-se o tempo que as algas permaneciam imersas na solução, e, tal como é visível na Figura 4-2, os melhores rendimentos (a rondar os 16%) foram obtidos para estas condições. Segundo Frei-Pelegrin e Robledo (1997) este decréscimo verificado, poderá eventualmente dever-se a uma possível degradação do polissacarídeo.

4.1.2.2. Tempo do pré-tratamento

Relativamente à duração do pré-tratamento, foram compilados todos os ensaios realizados para a otimização deste parâmetro, que se encontram representados na Figura 4-3. Sabendo que a concentração da solução alcalina ótima a ser utilizada seria equivalente a 6% (w/w) de NaOH, foi com esta concentração que foi realizada a otimização do parâmetro tempo do PT.

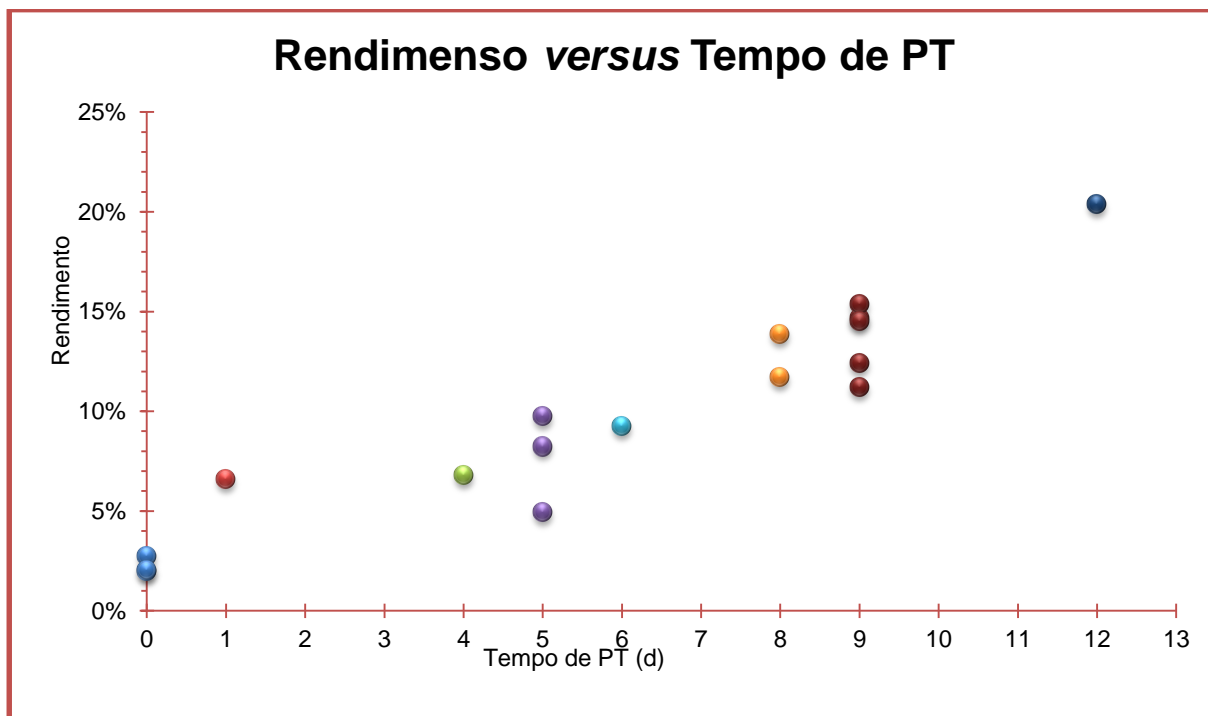
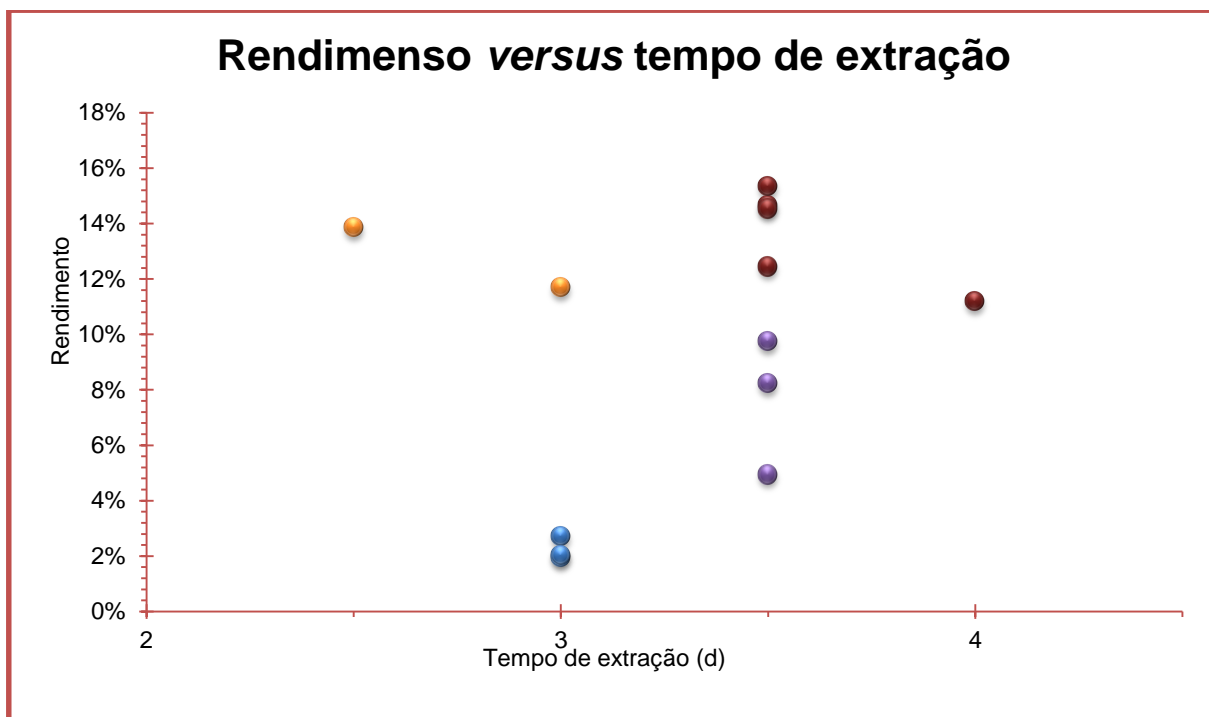


Figura 4-3 Rendimento da extração para grupos de experiências realizadas com [PT]=6% em que se variou o tempo de PT.[PT] significa concentração de NaOH no pré-tratamento.

Analisando a figura anterior, pode-se facilmente observar que o tempo de pré-tratamento influencia também o rendimento de uma extração, obtendo-se rendimentos maiores para pré-tratamentos mais prolongados. O melhor rendimento, de sensivelmente 20%, é obtido para 12 dias de pré-tratamento. No entanto, este tempo de duração de um pré-tratamento não tem interesse prático, em termos de recursos físicos é muito exigente. Como nesta altura se suspeitava que a etapa limitante do processo que condicionaria o rendimento da extração estaria na fase seguinte de neutralização das algas e, porque 8/9 dias de PT não apresenta ainda interesse prático, optou-se por assumir o tempo ótimo para o pré-tratamento como sendo os 6 dias.

4.1.2.3. Tempo de extração

De seguida, na Figura 4-4, foi também realizada uma representação gráfica que incluía ensaios que possuíam o mesmo tipo de pré-tratamento (cada serie delimitada a cor diferente, implica as mesmas condições nos parâmetros utilizados no PT), sendo que, desta vez o parâmetro a ser estudado seria o tempo efetivo de cada processo extrativo.



bibliografia, mesmo com os parâmetros descritos já otimizados, os rendimentos obtidos apresentavam valores muito baixos. Mesmo tendo consciência que alguns dos procedimentos, nomeadamente a filtração, podia ser responsável pela ocorrência de alguns erros experimentais e contribuir para a perda de algum do ágar extraído, o rendimento das extrações realizadas era muito inferior ao que era esperado. Com o decorrer das extrações, começou-se a observar que o passo de neutralização das algas pré-tratadas era importante para o resultado da extração. Assim, tal como descrito no capítulo 3, ao invés de se proceder à neutralização acrescentando pequenos volumes de uma solução concentrada de ácido à mistura com as algas provenientes do PT alcalino, pensou-se em realizar a respetiva neutralização transferindo as algas pré-tratadas para um banho com uma solução de H_2SO_4 0,03M. Na Figura 4-5, apresenta-se o resultado de duas extrações realizadas em condições semelhantes, sendo que, a única diferença significativa diz respeito ao processo de neutralização das algas pré-tratadas. Tal como se suspeitava, o processo de neutralização era então o passo limitante para uma boa extração. Como facilmente se conclui da Figura 4-5, o rendimento da extração com o novo procedimento para neutralizar as algas provenientes do PT aumentou aproximadamente para o triplo dos valores típicos obtidos nas extrações com o procedimento anterior, rondando os 30% de ágar extraído. Note-se, portanto, que um dos passos preponderantes foi o facto de mergulhar as algas num banho de ácido ao invés de ir acrescentando uma solução ácida mais concentrada até se obter um pH neutro para a mistura proveniente do PT.

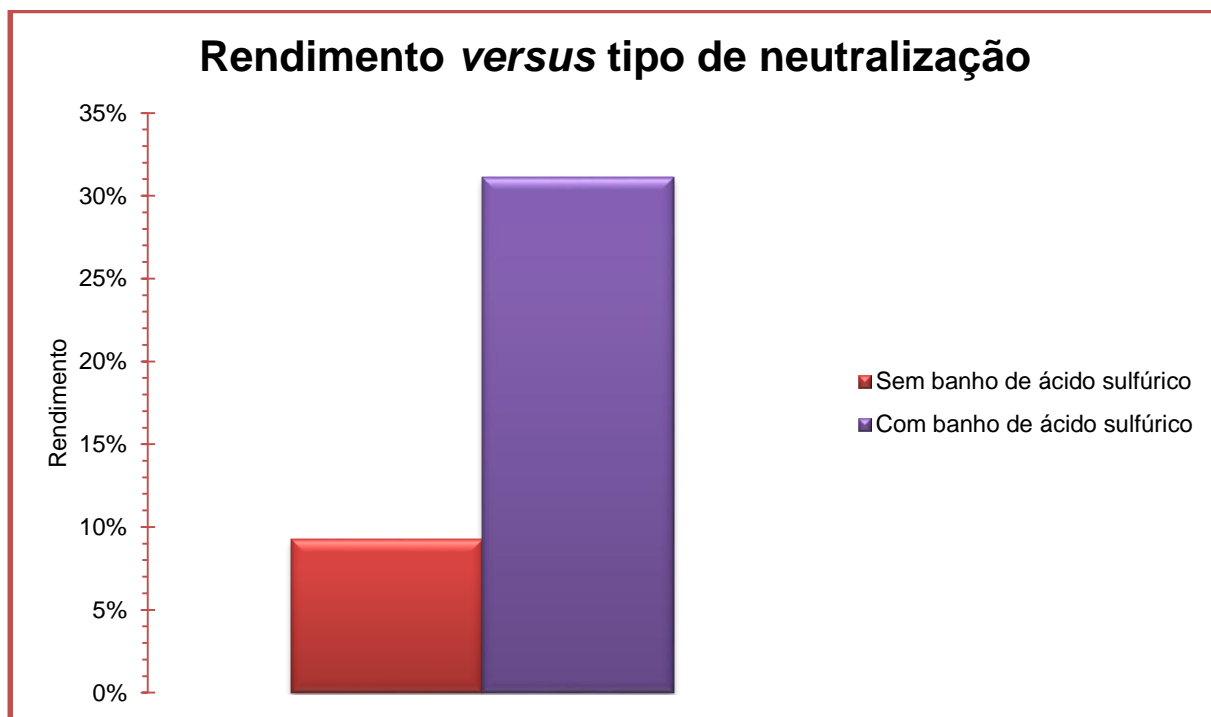


Figura 4-5 Rendimento para duas extrações realizadas em condições semelhantes, mas com diferentes procedimentos na fase de neutralização das algas.

Com base nestes resultados, encontrava-se o processo de pré-extração com as condições e procedimentos otimizados e restava apenas saber se as amostras de ágar obtidas apresentavam, ou não, qualidade suficiente para se garantir a obtenção de um produto com interesse comercial.

Para além da análise dos resultados em termos de rendimentos das extrações para avaliar as condições ótimas de operação, é conveniente proceder-se à análise quantitativa e qualitativa das amostras de ágar para averiguar da sua qualidade. Os resultados obtidos das análises feitas com o objetivo de caracterizar o ágar extraído são apresentados nas secções seguintes.

4.1.4. Caracterização do ágar obtido nas extrações realizadas para a otimização do processo

Para apurar a qualidade do ágar extraído nas experiências realizadas para a otimização do processo foram feitas três análises para quantificar a:

- força gel (para avaliar as propriedades mecânicas do gel);
- o teor de 3,6-anidrogactose;
- o teor de sulfato.

de cada amostra

4.1.4.1. Quantificação da força gel

Os ensaios para quantificar a força gel das amostras de ágar obtido nas extrações foram realizados com base no procedimento descrito no capítulo 3. Para servir de referência determinou-se também a força gel do ágar comercial usando o mesmo procedimento.

Os resultados obtidos nestes ensaios estão representados na Figura 4-6. A amostra de ágar comercial usada apresenta um valor de força do gel mais elevado do que qualquer uma das amostras do ágar extraído das algas utilizadas no presente trabalho. Outra conclusão que é possível retirar da observação do gráfico seguinte, é que a força gel para qualquer uma das amostras de ágar obtido de algas submetidas a um PT é muito superior à força gel do ágar obtido de algas sem pré tratamento alcalino antes da extração.

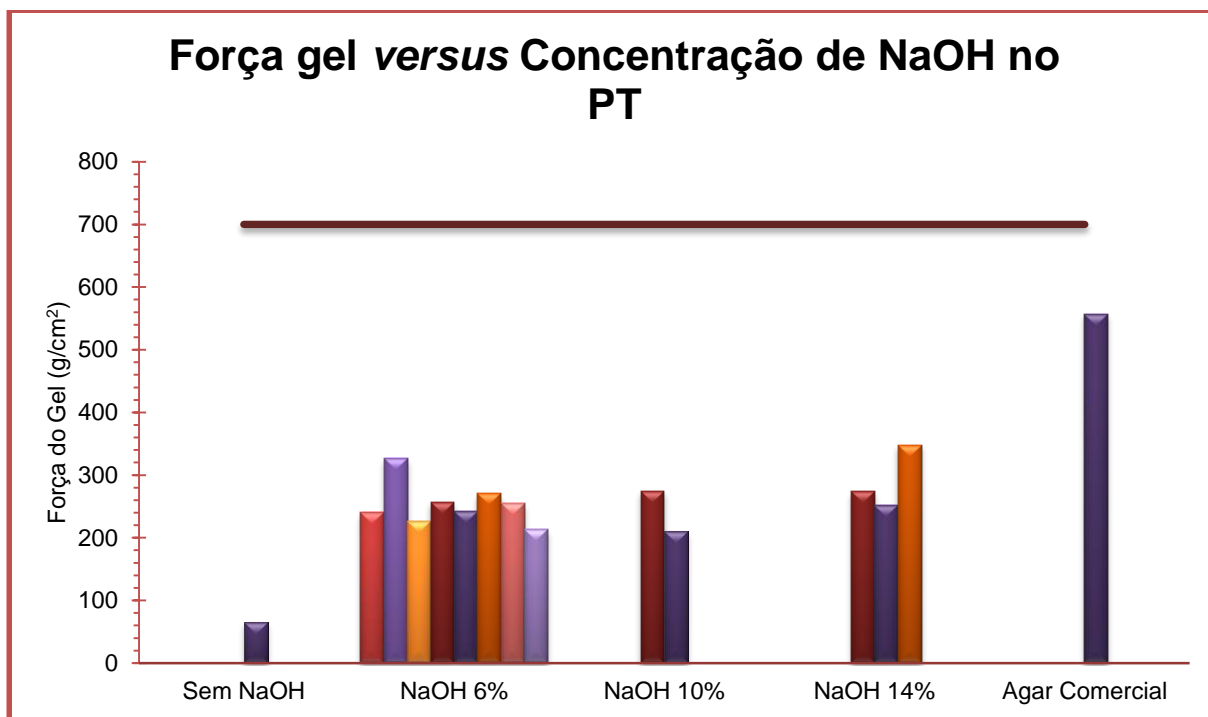


Figura 4-6 Força gel para o ágar obtido de algas submetidas a diferentes soluções alcalinas durante o PT. Note-se que as barras representam a média dos triplicados realizados para cada amostra de ágar a linha horizontal a pontilhado representa o limite inferior da força gel para o ágar ser considerado como um bom ágar.

De facto, como é visível através da figura anterior, o PT melhorou as propriedades gelificantes do ágar extraído. O valor máximo da força gel ($347,63 \text{ g/cm}^2$) foi obtido com o ágar proveniente de uma extração realizada com um PT alcalino com uma solução de NaOH a 14%. No entanto e de um ponto de vista sustentável em relação à utilização de NaOH para o PT, comparando o resultado obtido para este ensaio com os obtidos para um pré-tratamento a 6%, a diferença não é significativa, tendo sido obtido um valor máximo de força gel de $326,08 \text{ g/cm}^2$ para o pré tratamento a 6% (o que reforça que esta seria a concentração ótima a usar no processo). Este resultado vai de encontro ao apresentado por Villanueva (2009).

É de salientar o facto de os valores apresentados no gráfico da Figura 4-6 representarem a média aritmética dos valores de força gel de três ensaios realizados com gel obtido da mesma amostra de ágar. No entanto, houve amostras em que não foi possível a leitura da força gel porque o gel obtido do ágar apresentava pouca consistência, possuindo uma força gel inferior ao limite inferior detetável pelo equipamento desenvolvido, que era 247,60 gramas, imposto pela massa do pequeno cilindro em contacto com a superfície do gel (ver capítulo 3). Nos processos de extração em que não se obteve ágar em quantidade suficiente não foram realizados ensaios para determinação da força gel em triplicado.

Nos três ensaios realizados com o gel obtido do ágar extraído das algas sem PT, em dois deles verificou-se que não possuíam força gel suficiente para ser detetável pelo equipamento

de medição utilizado no presente estudo, e o terceiro ensaio apresentou, tal como era esperado, uma força gel muito baixa de 65,58 g/cm².

Comparando os valores obtidos para a força gel do ágar extraído das algas usadas no presente estudo e do ágar comercial com os valores mínimos indicados por Sousa (2008), Villanueva (2009) e também na fonte eletrônica AGARGEL (2003), para que o ágar apresente uma boa consistência e possa ser comercializado, que é de aproximadamente 700 g/cm² (indicado na Figura 4-6) pela linha horizontal a ponteados, verifica-se que são sempre inferiores. O valor médio medido para a força gel da amostra de ágar comercial foi de 475,80 g/cm², que é inferior ao limite mínimo recomendado para ser comercializado, o que pode indicar a falta de rigor nas medições efetuadas com o equipamento desenvolvido ou um procedimento pouco adequado. No entanto, como todas as medições foram obtidas em condições semelhantes foram possíveis as comparações em termos relativos da força gel. Assim sendo, pode-se concluir que a força gel das amostras de ágar extraídas das algas vermelhas submetidas a um PT alcalino com uma solução de NaOH de 6% é de aproximadamente metade do valor obtido com a amostra de ágar comercial.

4.1.4.2. Quantificação de 3,6-anidrogactose e do teor de sulfato

Relativamente à quantificação de 3,6-anidrogactose, como também à do sulfato, e com a finalidade de caracterizar o ágar extraído das experiências realizadas para se proceder à otimização do processo, todas as amostras foram analisadas segundo o procedimento descrito no capítulo 3. Note-se que, todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Na Figura 4-7, estão representados os valores obtidos para o teor de 3,6-anidrogactose e de sulfato, em percentagem, depois de analisar todas as amostras de ágar extraído nos ensaios realizados para otimizar o processo de extração.

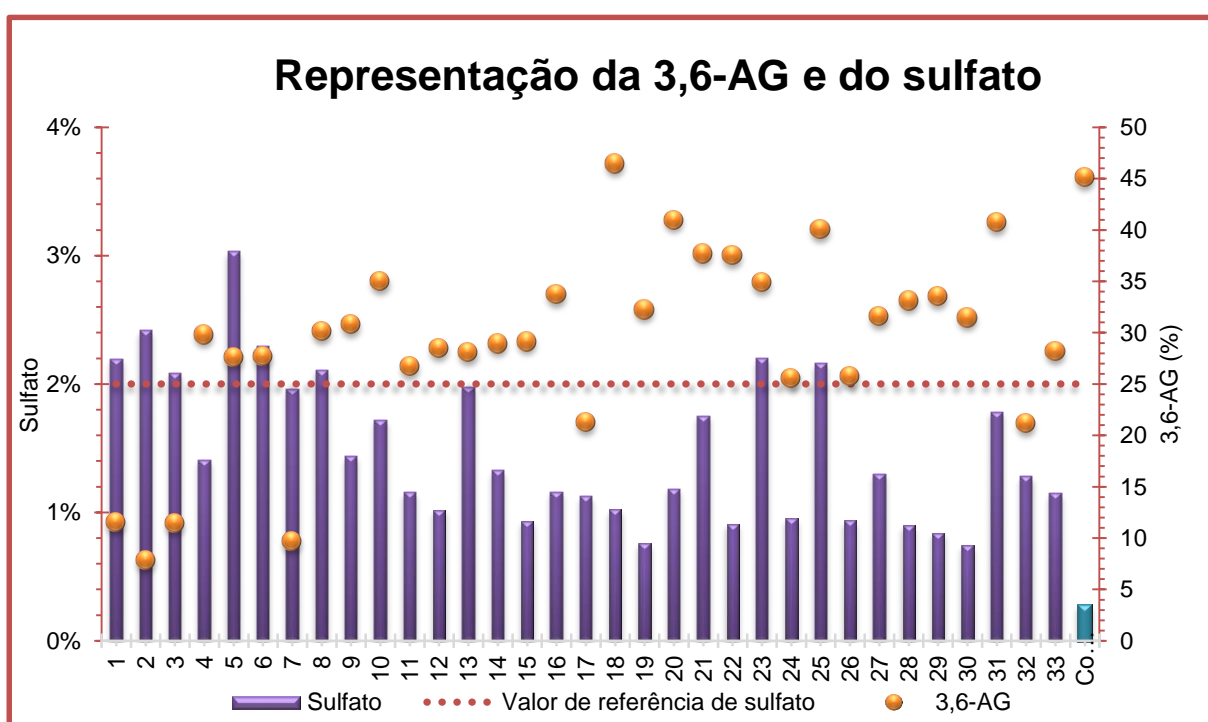


Figura 4-7 Valores de sulfato e de 3,6-anidrogactose para os ensaios realizados com o objetivo de otimizar o processo de extração. A linha horizontal a pontado representa o valor de referência considerado para o teor de sulfato no ágar Villanueva (2009)

Como já era de esperar, relativamente aos três ensaios realizados sem PT das algas, o ágar obtido apresenta um valor relativamente baixo para o teor de 3,6-AG (3 primeiros pontos representados na Figura 4-7) comparativamente com todos os outros ensaios que foram realizados com PT. Estes resultados estão de acordo com os reportados na bibliografia consultada. Segundo Sousa (2011), também para as extrações realizadas com agar nativo, isto é, extraído de algas sem PT, estas apresentavam um poder gelificante inferior às outras.

Os valores de 3,6-anidrogactose são bastante satisfatórios quando comparados com os valores obtidos para o ágar comercial.

Já no que diz respeito à quantificação do sulfato, tal como se pode verificar na, Figura 4-7, para as amostras de ágar nativo (3 primeiras), foram registados valores de sulfato mais elevados, pois na ausência de um PT, a conversão das moléculas sulfatadas de G-gactose em 3,6-anidro-L-gactose não existe. De acordo com a bibliografia consultada, a quantidade de sulfato presente em cada amostra deve ser inferior a 2% (R. D. Villanueva, 2009) e, em geral, todas as amostras apresentaram valores satisfatórios.

Em geral, quando o valor de sulfato nas amostras de ágar eram menores, as quantidades de 3,6-anidrogactose correspondentes eram superiores o que dava uma maior consistência ao gel formado. Este comportamento foi também referido por diversos autores tanto por Villanueva (2009), como também por Arvizu-Higuera e os seus coautores (2007).

Mais uma vez através dos resultados das análises ao teor de sulfato e de 3,6-AG das amostras de ágar se constatou a importância do pré-tratamento em meio alcalino para este género de algas, que contribui para a obtenção de um produto com melhores propriedades.

4.2. Processo de extração com as condições de operação otimizadas

Neste subcapítulo, serão apresentados e discutidos os resultados referentes às extrações realizadas já com as condições do processo otimizadas. De acordo com os ensaios de extração preliminares, apresentados anteriormente, pôde-se, então, verificar que existem essencialmente 3 etapas limitantes no processo de extração:

- o pré-tratamento, nomeadamente o tempo de duração e a concentração da solução alcalina usada;
- a neutralização antes da extração, para garantir que o meio se encontra a pH neutro;
- a extração propriamente dita, nomeadamente o tempo de duração.

A etapa posterior à extração, que diz respeito à filtração das algas, é também uma fase importante para garantir que todo o ágar extraído das algas é quantificado no cálculo do rendimento do processo.

Tendo em atenção estas etapas, o processo foi então otimizado e foram realizados mais 18 ensaios com os parâmetros encontrados para obter melhores resultados não só em termos de rendimento, mas também de qualidade do produto final obtido. Assim, e tal com foi discutido nas secções anteriores, as condições usadas foram:

- uma massa de aproximadamente 25 g de algas previamente lavadas e secas;
- um pré-tratamento alcalino com uma solução de NaOH a 6% (w/w);
- um tempo de pré-tratamento em meio alcalino durante 6 dias;
- uma neutralização garantida num banho de ácido sulfúrico a 0.03 M;
- um tempo de extração de 2,5 h;
- uma filtração do ágar o mais eficaz possível.

Como todos estes parâmetros e procedimentos foram mantidos nas experiências realizadas, os resultados obtidos deveriam ser semelhantes, quer no que respeita a eficácia da extração, quer no que se refere à qualidade do ágar obtido.

Com o intuito de se verificar a reprodutibilidade do processo de extração com as condições otimizadas, de seguida são apresentados os resultados obtidos para o rendimento do processo e para os parâmetros quantificados para caracterizar a qualidade do ágar.

4.2.1. Rendimento

Na Figura 4-8 são apresentados os valores dos rendimentos das extrações realizada em condições semelhantes após a otimização do processo. Na figura é apresentado também o valor médio obtido para o rendimento, assim como a grandeza da dispersão dos valores obtidos nos diversos ensaios em torno do valor médio, traduzida pelo desvio padrão, que está representado pela linha vertical sobre a barra correspondente ao valor médio do rendimento.

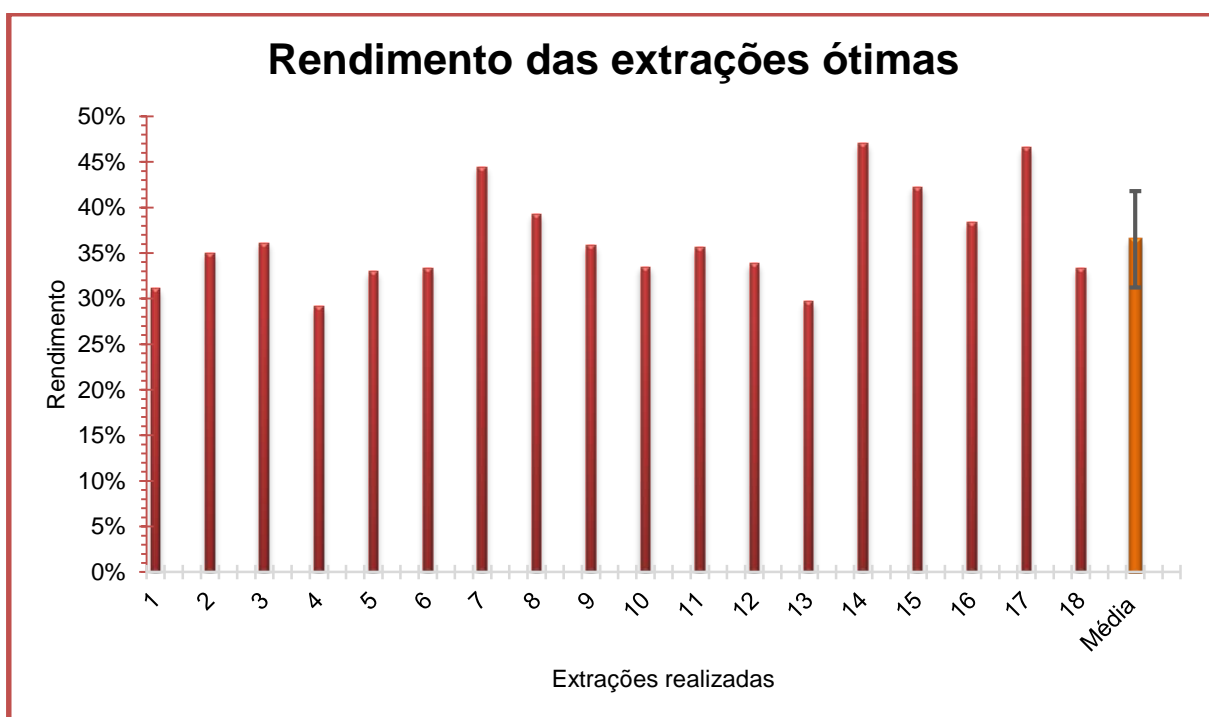


Figura 4-8 Valores de rendimento obtidos em todas as extrações realizadas depois da otimização do processo. A linha vertical sobre a barra representa o desvio padrão dos resultados.

Conforme era de esperar, depois da otimização do processo, conseguiram-se efetivamente rendimentos das extrações bastante satisfatórios, entre 29,14% e 47%. Estes rendimentos encontram-se dentro da gama de valores referidos para extrações semelhantes em diversos estudos levados a cabo por outros autores (R. D. Villanueva, 2009) e (Sousa, 2008).

Arvizu-Higuera e os seus coautores (2007), encontraram para a *Gracilaria vermiculophylla* um rendimento máximo para a extração de ágar que rondava os 15%. Este valor não foi corroborado por Villanueva (2009), que obteve rendimentos para o mesmo género de algas, à volta dos 25%. Por sua vez, este trabalho serviu de base para o estudo desenvolvido por Sousa (2008) que encontrou valores de rendimento a rondarem os 30%.

Uma discussão mais detalhada da dispersão dos resultados obtidos para os rendimento das extrações será apresentada posteriormente, conjuntamente com a análise dos parâmetros que traduzem a qualidade do ágar obtido.

Tendo obtido rendimentos para as extrações realizadas nas condições ótimas bastante satisfatórios, faltava, então, analisar a qualidade tanto em termos de propriedades mecânicas como físico-química do ágar extraído. Posto isto, foram realizados os devidos ensaios e de seguida são apresentados estes resultados.

4.2.2. Força gel do ágar

Na Figura 4-9 são apresentados os resultados obtidos para os ensaios da força gel realizados com as amostras de ágar obtida em cada uma das 18 extrações efetuadas com as condições otimizadas. Foi também medida a força gel com um ágar comercial, usando o mesmo procedimento, que serviu de comparação para avaliar a qualidade do ágar obtido no presente estudo em termos de propriedades mecânicas.

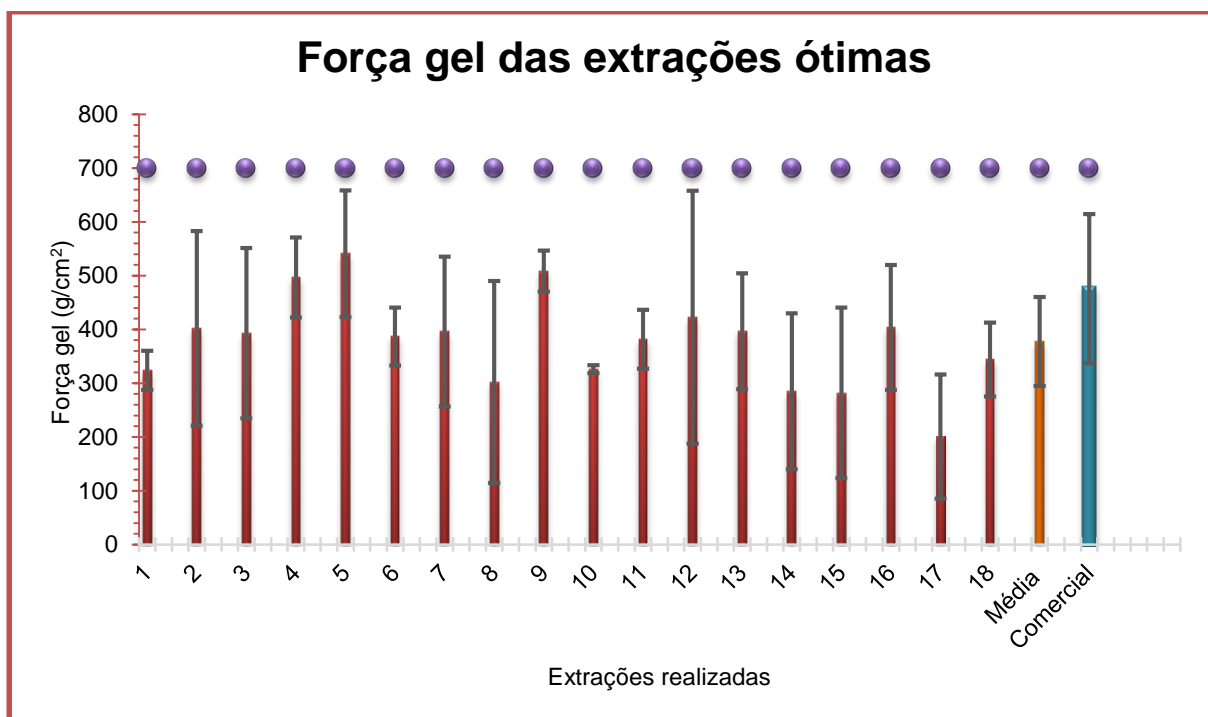


Figura 4-9 Força gel medida para o gel do ágar obtido em diferentes extrações com as condições ótimas. As linhas verticais sobre as barras dizem respeito ao desvio padrão dos ensaios em triplicado realizados com cada amostra, ou ao desvio padrão das médias dos ensaios realizadas com as diversas amostras. A linha a pontilhado indica o limite mínimo da força gel segundo valores de referência

Como se pode verificar da Figura 4-9, a dispersão dos valores obtidos nos ensaios realizados em triplicado para determinar a força gel de algumas amostras de ágar é muito grande, o que parece indiciar mais uma vez que o procedimento e o equipamento desenvolvido carecia,

ainda, de melhoramentos. No entanto, é possível verificar que a força gel média de todas as amostras de ágar extraídas em condições semelhantes apresentou um valor de 378g/cm^2 , que é cerca de 20% inferior ao obtido para a força gel do agar comercial, que apresentou um valor de, aproximadamente, 475g/cm^2 . Tal como foi referido anteriormente, é indicado segundo o site AGARGEI (2003), o valor mínimo de força gel de 700 g/cm^2 para o ágar ser considerado de boa qualidade, e como se pode verificar da Figura 4-9, todas as amostras de ágar obtidas apresentam valores inferiores para a força gel. A medição desta grandeza pode ter erros experimentais associados, pelas razões já indicadas, pelo que os valores absolutos desta grandeza devem ser vistos com alguma reserva. Mesmo assim, comparando com os valores de força gel indicados por alguns autores para o ágar obtido de algas do mesmo género, como Villanueva (2009) e Arvizu-Higuera e os seus coautores (2007), 412 g/cm^2 e 720 g/cm^2 , respetivamente, a força gel do ágar obtido no presente trabalho é de uma ordem de grandeza semelhante.

4.2.3. Quantificação de 3,6-anidrogactose e sulfato

Tendo medido o parâmetro que permitia qualificar em termos das suas propriedades mecânicas o ágar obtido, faltava quantificar os parâmetros que possibilitariam a sua qualificação a nível químico. Para tal, de seguida são apresentadas duas representações gráficas, sendo que a primeira, serve para apresentar a quantificação de 3,6-anidrogactose obtida em cada amostra analisada e na segunda é visível a quantidade de sulfato presente nas mesmas.

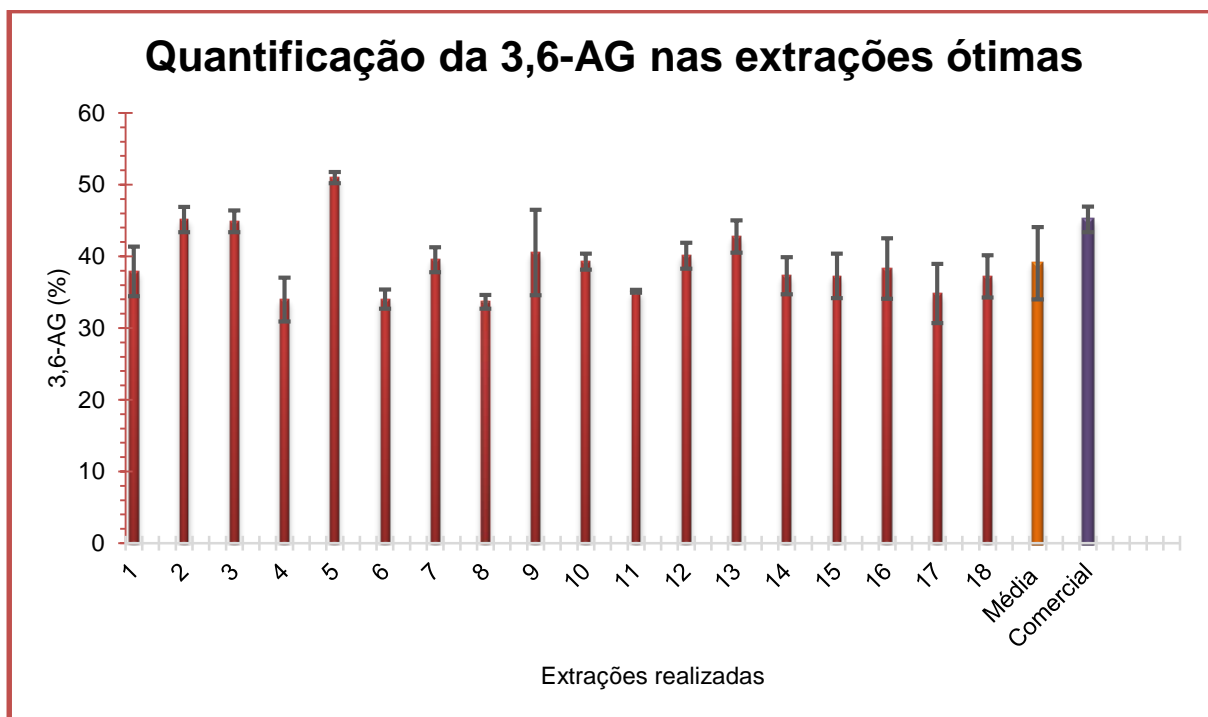


Figura 4-10 Quantificação de 3,6-AG nas amostras de ágar obtidas nas extrações realizadas com as condições otimizadas. As linhas verticais sobre as barras dizem respeito ao desvio padrão dos ensaios em triplicado realizados com cada amostra, ou ao desvio padrão das médias dos ensaios realizadas com as diversas amostras.

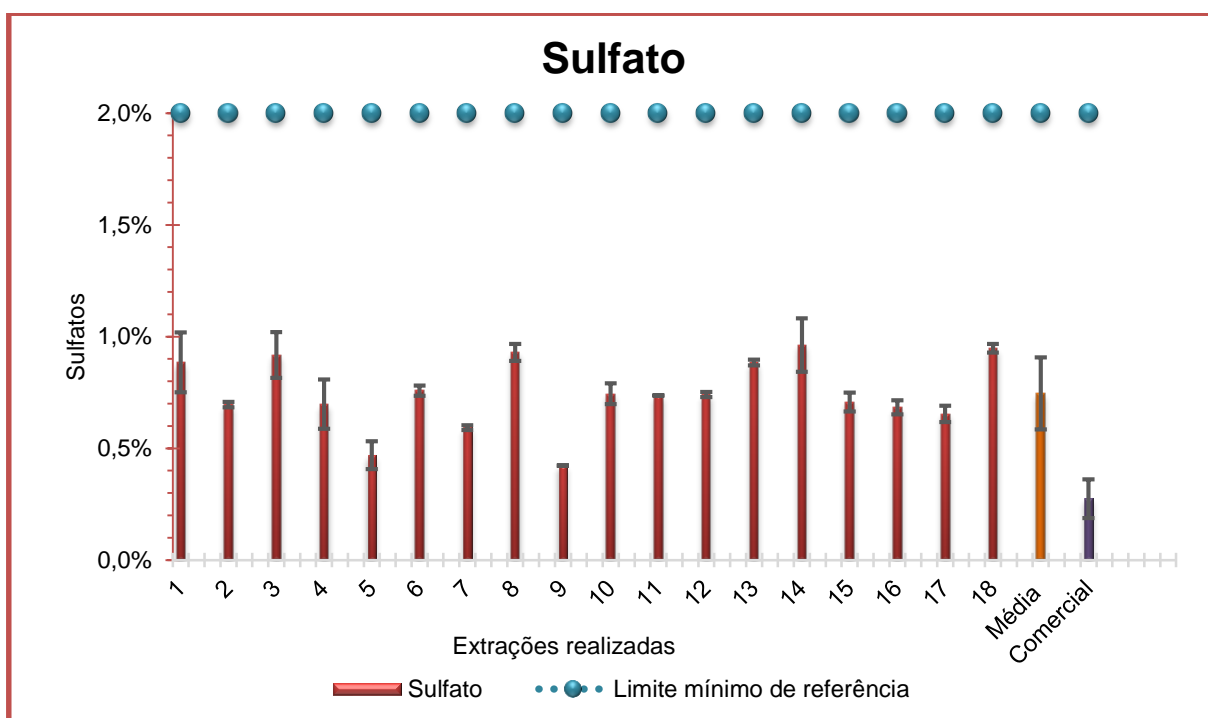


Figura 4-11 Quantificação do sulfato nas amostras de ágar obtidas nas extrações realizadas com as condições otimizadas. As linhas verticais sobre as barras dizem respeito ao desvio padrão dos ensaios em triplicado realizados com cada amostra, ou ao desvio padrão das médias dos ensaios realizadas com as diversas amostras. Note-se que o limite máximo indicado a 2% segue como referência Villanueva (2009).

Com base nas figuras apresentadas, pode-se facilmente comprovar que a dispersão observada nos ensaios realizados em triplicado, em geral, não é significativa. Relativamente ao teor de 3,6-AG nas amostras, o maior valor do desvio padrão encontrado correspondeu a cerca de 14% do valor médio, sendo na maioria dos outros casos bastante inferior a 10%. Já no que diz respeito ao teor de sulfato na amostra, a dispersão nos triplicados é maior, verificando-se em algumas amostras um desvio padrão que corresponde a uma percentagem entre 11 e 16%. Relativamente à dispersão de resultados obtidos com amostras de ágar provenientes das diferentes extrações realizadas com as condições de operação otimizadas esta será discutida em detalhe na análise estatística efetuada.

No entanto, comparando os valores médios do teor de 3,6-AG e de sulfato no ágar extraído das algas usadas no presente trabalho com os indicados na bibliografia os resultados são semelhantes. Villanueva e os seus coautores (2009) e Sousa (2008), apresentaram nos seus trabalhos realizados com algas do mesmo género teores, aproximadamente, 2% para ambos. Contudo, diversos autores apresentam conteúdos de sulfato bastante mais elevados no ágar.

Este facto pode dever-se ao habitat da matéria-prima, que apesar de ser constituída por algas do mesmo género desenvolveram-se num habitat com características diferentes das da piscicultura localizada na Ria de Aveiro, onde as algas usadas no presente trabalho foram

recolhidas. Vivek e os seus coautores (2009), apresentaram uma quantidade de sulfato para a *Gracilaria cliftonii* bastante superior, isto é, a variarem entre os 5% e os 7,5%, relativamente à obtida neste estudo.

Com a finalidade de se tentar avaliar a reprodutibilidade do processo de extração realizado com as condições de operação otimizadas foi realizado um pequeno estudo estatístico com os resultados obtidos nas 18 experiências conduzidas com condições semelhantes de forma a quantificar a dispersão dos resultados. Este estudo é apresentado na secção seguinte.

4.2.4. **Análise estatística dos resultados**

Neste subcapítulo serão apresentados os resultados referentes a cada um dos parâmetros anteriormente descritos em diagramas de extremos e quartis e será feita a respetiva discussão, agora em termos estatísticos. Para a construção destes diagramas, foram calculados os valores das medidas amostrais: limite inferior, limite superior, mediana, 1º e 3º quartil. Estes valores foram obtidos a partir do *software IBM SPSS Statistics 22*.

Na Figura 4-12 estão, então, apresentados os diagramas de extremos e quartis referentes aos parâmetros avaliados para as extrações realizadas com as condições de operação otimizadas: o rendimento da extração, a força gel, o teor em 3,6-AG e sulfato do ágar obtido.

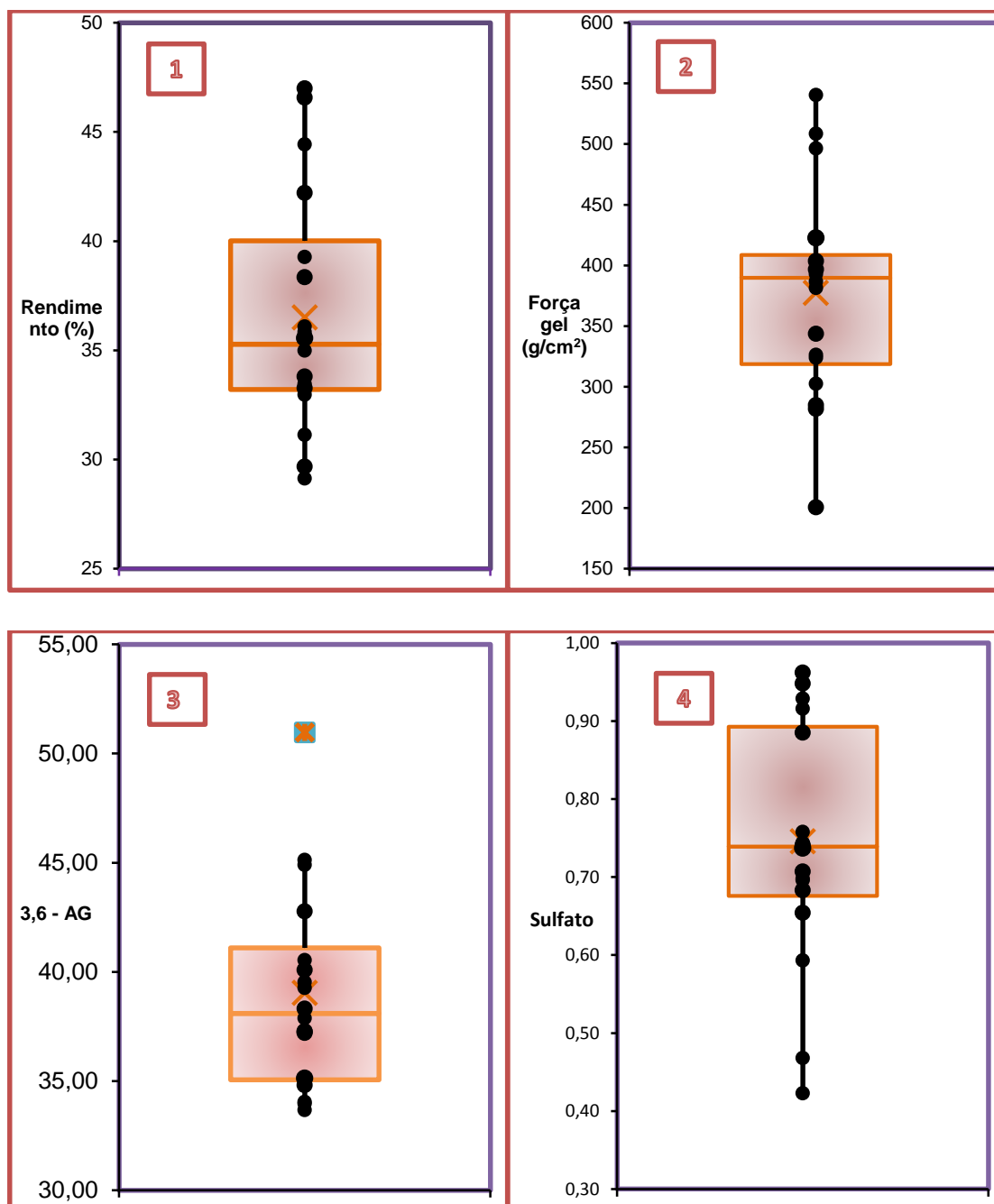


Figura 4-12 Diagramas de extremos e quartis para os diversos parâmetros determinados nas extrações com as condições de operação otimizadas. 1- rendimento das extrações 2-força gel 3- 3,6-AG 4-Sulfato

Os diagramas apresentados anteriormente apresentam a vantagem de tornar bem visível a dispersão dos resultados relativos a cada parâmetro estudado.

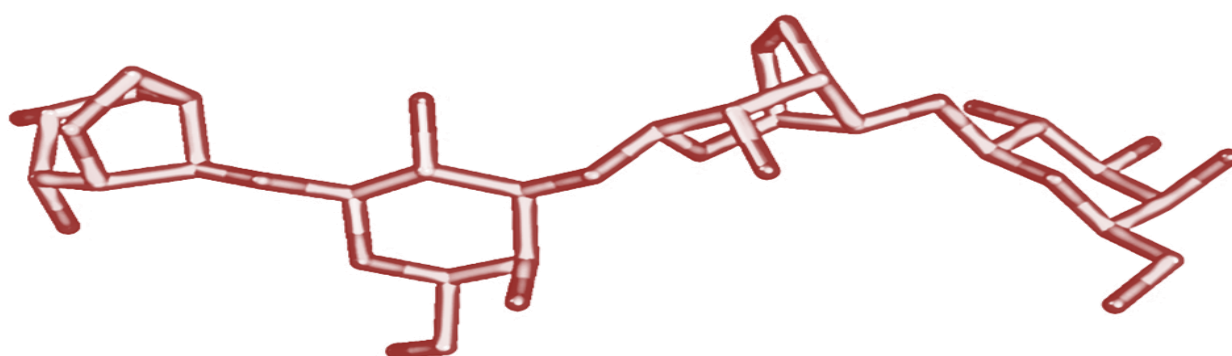
De facto, estes diagramas de extremos e quartis consistem numa representação onde simultaneamente se pode visualizar os resultados obtidos e alguns parâmetros estatísticos que permitem avaliar a dispersão de um conjunto de dados numéricos. O limite superior da caixa representada indica o valor do 3º quartil (75%), o limite inferior assinala o valor do 1º

quartil (25%) e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana (50%) dos valores representados. Então, abaixo do limite do 3º quartil, encontram-se 75% dos resultados obtidos para o parâmetro e abaixo do limite do 1º quartil 25% dos resultados. No interior da caixa situam-se 50% dos valores dos parâmetros medidos. Todos os resultados que se encontram distanciados de um valor superior a 1,5 vezes a distância interquartil (distância entre os limites que assinalam o 1º e o 3º quartil) acima do 3º quartil e abaixo do 1º quartil afastam-se do padrão geral dos resultados e são normalmente designados por *outliers*. A linha vertical superior à caixa indica o valor máximo (depois de removidos os *outliers*, se existirem) e a linha vertical inferior à caixa estende-se até ao valor mínimo obtido (depois de removidos os *outliers*, se existirem).

Assim, dos diferentes diagramas apresentados na Figura 4-12, verifica-se que em: 1 - os rendimentos obtidos variaram entre 29,14% e os 47%; 2 - a variação dos valores obtidos para a força gel foi entre 200,85 g/cm² e 540,51 g/cm²; 3 - a 3,6-anidrogactose variou entre 33,68 e 45,13% e 4 - o teor em sulfato apresentou valores entre 0,423 e 0,962%. Tendo em conta que em nenhum dos diagramas apresentados a média (assinalada por X no interior da caixa) coincide com a mediana, é aconselhável usar a mediana como sendo a medida de tendência central mais importante. Note-se que no diagrama representativo de 3,6-AG, foi identificado um *outlier* (assinalado no gráfico e que corresponde ao valor de 45,13%), pelo que este deverá ser rejeitado na análise deste parâmetro. De acrescentar ainda o facto de todos os diagramas apresentados serem assimétricos.

Tendo em atenção o valor da mediana, ou 2º quartil de cada parâmetro analisado, sabe-se que metade das ocorrências de cada parâmetro se encontra abaixo da mesma e que os restantes 50% se encontram acima desta. Quer isto dizer que, segundo a Figura 4-12, para as experiências de extração realizadas, o rendimento de 50% das experiências encontram-se entre 29,14% e 35,29 e as restantes 50% das experiências apresentaram rendimentos acima do segundo quartil até aos 47%. Quanto aos restantes parâmetros estudados, para caracterizar a qualidade do ágar extraído, verifica-se para a força-gel que metade dos valores obtidos são inferiores a 389,90 g/cm², para o teor de 3,6-AG e de sulfato, metade dos valores medidos estão localizados abaixo de 38,11% e 0,74%, respetivamente.

Os limites mínimos e máximos em que variavam todos os parâmetros estudados, permite avaliar a amplitude das ocorrências. Neste caso particular, o rendimento apresentou uma amplitude de 17,86%, a força gel uma amplitude de 339,66 g/cm²e, em relação ao teor de 3,6-AG e sulfato, estes apresentaram uma amplitude de 11,45% e 0,54%, respetivamente. A amplitude apresentada para os diversos parâmetros é significativa o que pode corroborar o que foi já referido diversas vezes, quanto a não uniformização das características da matéria-prima e também quanto à dificuldade de reproduzir exatamente os procedimentos durante o processo de extração do ágar.



CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Com a realização desta dissertação, foram alcançados e validados os principais objetivos, ao comprovar que as algas *Gracilaria vermiculophylla* recolhidas na Ria de Aveiro permitiam a extração do ágar e que o mesmo teria qualidade suficiente (segundo os parâmetros estudados) para que pudesse ser comercializado. Pode-se, assim, afirmar que o trabalho experimental desenvolvido e os procedimentos implementados decorreram com sucesso.

Inicialmente, foram realizados ensaios com algas sem qualquer tratamento prévio de maneira a comprovar que, para este género de algas, seria necessário utilizar um pré-tratamento para a obtenção de uma maior quantidade de ágar e com qualidade superior.

Posteriormente, foi implementado um pré-tratamento alcalino, que depois de serem testadas diversas condições, tais como a concentração da solução de NaOH usada e o tempo do pré-tratamento, foi possível identificar o passo mais importante e que limitava o processo seguinte de extração. Assim, concluiu-se que o que condicionava a extração de ágar a partir deste género de algas, estava centrado na etapa de neutralização das algas pré-tratadas, para garantir uma extração em meio neutro (pH=7). O procedimento da etapa posterior de filtração, para separar o ágar extraído das algas, era também importante para garantir a recuperação do produto final.

Com a metodologia de neutralização adequada, que consistia em mergulhar as algas pré-tratadas num banho de ácido sulfúrico a 0,03 M durante 15 min, com as condições do pré-tratamento otimizadas (concentração da solução de NaOH de 6% (w/w) e duração do pré-tratamento de 6 dias), o tempo de extração mais apropriado como sendo de 2,5 h e, ainda, a filtração das algas da extração levada a cabo com o auxílio de um pano de algodão, foram realizadas diversas experiências para verificar a reprodutibilidade do processo. Das 18 experiências realizadas com as condições de operação otimizadas obteve-se:

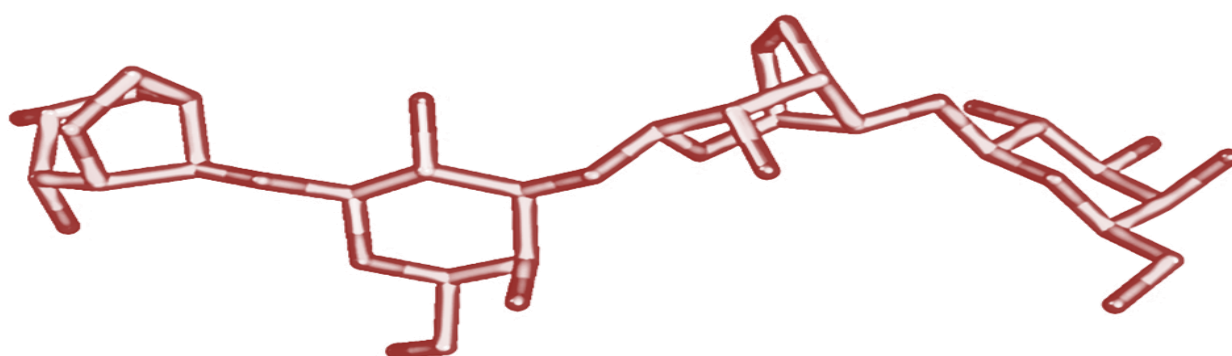
- um rendimento para a extração do ágar que variou entre 29,14% e 47,00%;
- uma força gel para o ágar obtido compreendida entre 200,85 g/cm² e 540,51 g/cm²;
- um teor de 3,6-anidrogálatose que variou entre 33,68% e 45,13%;
- um teor de sulfato entre 0,42% até 0,96%.

Os valores encontrados para os diversos parâmetros estão de acordo com o apresentado no trabalho de Villanueva e os coautores (2009), que usaram como matéria-prima algas do mesmo género e de idêntica proveniência.

Para concluir quanto à potencialidade de ágar extraído ser comercializado, estes parâmetros que traduzem a qualidade do ágar foram comparados com os obtidos para uma amostra de ágar comercial, usando as mesmas metodologias. O teor de 3,6-anidrogactose e de sulfato obtido para o ágar comercial foi de $45,16\% \pm 1,80\%$ e de $0,27\% \pm 0,09\%$, sendo o primeiro parâmetro semelhante ao obtido para o ágar extraído no presente trabalho. Quanto ao teor de sulfato, apesar da percentagem obtida nas amostras de ágar ser superior ao medido para o ágar comercial, esta é inferior ao limite máximo de 2% que é indicado para ser possível a sua classificação como um “bom ágar”. Relativamente à força gel, a amostra de ágar comercial apresentou um valor médio de $475,80 \text{ g/cm}^2$, que está incluído na gama de valores encontrado para as amostras de ágar extraído no presente trabalho. Contudo, estes valores são inferiores ao valor mínimo recomendado para que o gel apresente uma boa consistência, que é 700 g/cm^2 . A força gel foi medida usando um equipamento construído para o efeito, por não se dispor de um texturómetro, pelo que se suspeita que, quer o procedimento, quer o equipamento desenvolvido careciam, ainda, de melhoramentos. No entanto, em termos relativos a força gel do ágar extraído é comparável à do ágar comercial.

Em suma, com a realização desta dissertação, foi possível comprovar que este género de algas, *Gracillaria vermiculophylla*, poderá ter potencial para constituir uma fonte de matéria-prima para pequenas e médias indústrias de extração de ágar e, simultaneamente, valorizar um resíduo das pisciculturas instaladas na Ria de Aveiro. O rendimento do ágar extraído das algas revelou-se satisfatório, o que aliado ao elevado teor de 3,6-anidrogactose e à reduzida percentagem de sulfato, lhe confere características que se mostram promissoras para o mercado internacional.

Futuramente, sabendo que as macroalgas desempenham um papel fundamental tanto nos ecossistemas marinhos, como também no próprio valor económico de algumas espécies, torna-se evidente a necessidade de serem realizados estudos que permitam o aprofundamento dos conhecimentos nesta área. No processo de extração, mais especificamente na fase de filtração, uma das possibilidades seria a implementação de um mecanismo de filtração a pressão reduzida.



CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABQ-RN. 2007. Bioquímica e Biotecnologia. *FICOCOLÓIDES DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E COMPORTAMENTO REOLÓGICO*. [Online] Associação Brasileira de Química - Seção Regional do Rio Grande do Norte, 2007. <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/11/11-470-624.htm>.

ABREU, MARIA H.; PEREIRA, RUI; SOUSA-PINTO, ISABEL; YARISH, CHARLES. 2011. Ecophysiological studies of the non-indigenous species *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta) and its abundance patterns in Ria de Aveiro lagoon, Portugal. s.l. : European Journal of Phycology, 2011. pp. 453-464.

AGARGEL. 2003. AGARGEL. [Online] 2003. [Citação: 16 de Dezembro de 2014.] <http://www.agargel.com.br/agar-tec.html>.

AQUICULTURA, PANORAMA DA. 1997. Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. 1997.

Armisen, R. e Galatas, F. 2000. Agar. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), Handbook of hydrocolloids. 2000.

Arvizu-Higuera, D.L.; , Rodríguez-Montesinos, Y.E.; Murillo-Álvarez, J.I.; Munoz-Ochoa, M.; Hernández-Carmona, G. 2007. Effect of alkali treatment time and extration time on agar from *Gracilaria Vermiculophylla*. México : Journal of Applied Phycology, 2007.

Battacharya, D. e Medlin, L.,. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. 1998.

BIOLOGICAL, NBII-NATIONAL e SPECIES, INVASIVEI, NFORMATION,. 2011. Global Invasive Species Database. *Gracilaria vermiculophylla (aquatic plant)*. [Online] Invasive Species Specialist Group, 2011 de Abril de 2011. <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=1698&fr=1&sts=&lang=EN>.

Chigasaki, Shuji Doi; Saito, Tomiji; Kawasaki; Tozaki, Shigenobu; Fukjisawa. 1975. Process for the production of agar from a red alga. 26 de Agosto de 1975.

Chirapart, A.; M., Ohno; H., Ukeda; Sawamura, M.; K., Hirozo. 1995. Effects of partial acid hydrolysis on physical and chemical properties of agar from a newly reported Japanese agarophyte (*Gracilariopsis lemaneiformis*). s.l. : Journal of Applied Phycology, 1995.

- Duarte, Pedro Manuel da Silva. 1994.** *ECOLOGIA DA ALGA AGARÓFITA Gelidium sesquipedale. Modelação matemática da produtividade e dinâmica populacional.* Lisboa : s.n., 1994.
- Fei, X.G. e Huang, L.J. 1991.** Artificial sporelling and field cultivation of *Gelidium* in China. 1991.
- Ferrario, M e Sar, E. 1996.** Macroalgas de interes econômico. Cultivo, manejo, industrialización. 1996.
- Florêncio, Isanna Menezes e Eliane Rolim Florentino, Flávio Luiz Honorato da Silva, Vanessa Silva Fernandes, Mónica Tejo Cavalcanti. 2012.** Study of the Extraction of Macroalga of Agar *Gracilaria caudata* J. Agardh Purposes For Use In Food. 2012.
- Freile-Pelegrin, Y. e Murano, E. 2004.** Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán peninsula. 2004.
- Freile-Pelegrín, Y. e Robledo, D. 1997.** Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatán Mexico. s.l. : Journal of Applied Phycology, 1997.
- Jarro. 2010.** Agar ou agar-agar, o mais antigo ficocoloide. *ADITIVOS & INGREDIENTES.* 2010.
- Jesus, Dora. 2012.** Naturalink. *Gelidium, a alga vermelha do ágar ágar.* [Online] 2012. [Citação: 18 de Dezembro de 2014.] <http://naturlink.sapo.pt/Natureza-e-Ambiente/Fichas-de-Especies/content/Gelidium-a-alga-vermelha-do-agar-agar?bl=1>.
- Jones Kaine, J. M. e C., Destombe. 1995.** A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. s.l. : Journal of Applied Phycology, 1995.
- Lee, S.C., Prosky, L. e Devries, J.W. 1992.** Determination of total, soluble and insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. 1992.
- Magne, F. 1993.** Importance of basic research in applied phycology. 1993.
- Marinho-Soriano, E. e Bourret, E. 2003.** Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (*Gracilariaceae*, Rhodophyta). 2003.
- Marinho-Soriano, E.; Bourret, E.; Casabianca, M.L. de; Maury, L. 1998.** Agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria bursa-pastoris*. 1998.
- McHugh, D. J. 2003.** A guide to seaweed industry. [Online] 2003. [Citação: 30 de Novembro de 2013.]

Ogawa, M. e Koike, J. 1987. Manual de Pesca. 1987.

Ornellas, L. H. 2006. Técnica e dietética, seleção e preparo de alimentos. 2006.

Pateira e Oliveira. 1990. Utilização de macroalgas em produtos cosméticos. 1990.

Pereira, Leonel. 2007. As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. [ed.] Departamento de Botânica. Coimbra : Universidade de Coimbra - FCTUC, 2007.

R. D. Villanueva, A. M. M. Sousa, M. P. Gonçalves, M. Nilsson & L. Hilliou. 2009. Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). Aveiro, Portugal : Springer Science, Business MEdia B.V. , 9 de Maio de 2009.

Raven, P.H., Ever, R. F. e Eichhorn, S. E. 2001. Biologia Vegetal. 2001.

REBOUÇAS, ROSINERE FERREIRA DA COSTA. 2013. Estudo do Teor de Lipídios e Avaliação dos resíduos das Algas Marinhas: *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae*, *Gracilaria domingensis* para preparação de Biodiesel e Biofertilizante. Mossoró - RN : s.n., 2013.

Ribeiro, Elsa Alexandra do Nascimento. 2011. Cinética da libertação de fármacos a partir de matrizes sólidas. Coimbra : Instituto Superior de Engenharia de Coimbra, 2011.

Santos, Janaína Pires. 2011. Avaliação do teor e análise qualitativa do agar das espécies *Gelidiella acerosa* (forsskal) feldmann and G.Hamel (Gelidiales, Rhodophyta) e *Gracilaria Domingensis* (kutzing) sonder ex dickie em costões rochosos dos municípios de ilhéus e Uruçuca. 2011. Dissertação.

Santos, R. e Duarte, P. 1991. Marine plant harvest in Portugal. s.l. : Journal of applied Phycology, 1991. Vol. 3.

Santos, R. 1991. The use of transition matrices to model the demography of plants. 1991.

Silva, Andreia Susana Gomes da. 2011. Determinação do coeficiente de difusão do maleato de timolol em lentes de contacto. Coimbra : s.n., 2011.

Sousa, Ana Margarida Moreira de. 2008. Aplicação de biopolímeros extraídos de algas na produção de embalagens biodegradáveis. Porto : FEUP, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Julho de 2008.

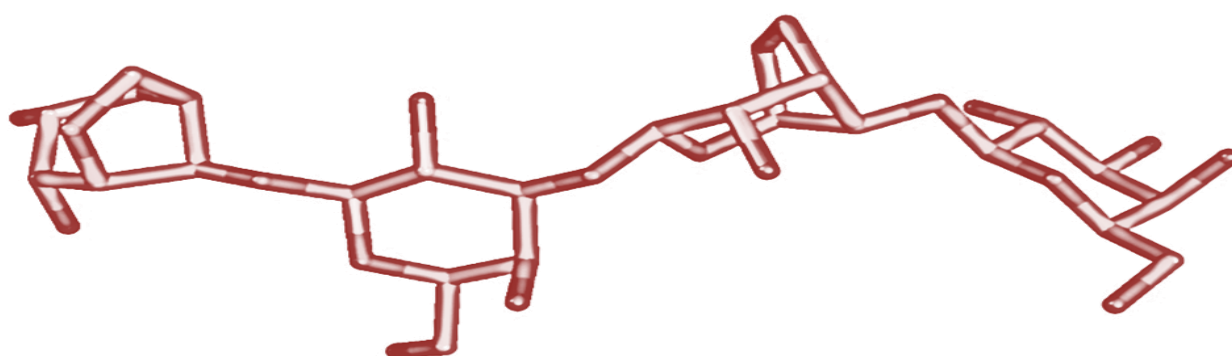
Steentoft, M., Irvine, L.M. e Farnham, W.F.,. 1995. Two species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. 1995.

Stephen, A.M., Phillips, G. O. e Williams, P. A. 2006. *Food Polysaccharides and their Applications - Second Edition*. New York : Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

Veiga. 1975. Actividades agro-marítimas em Portugal. 1975.

Vivek, Kumar e Ravi, Fotedar. 2009. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii*. 2009.

Yoshimura, Cristalina Yoshie. 2006. Avaliação do potencial de cultivo e produção de agar de *gracilaria domingensis* e de *gracilaria caudata* (rhodophyta, gracilariales) na enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina). São Paulo : s.n., 2006.



CAPÍTULO 7 – APÊNDICES

7. APÊNDICES

7.1. Valores intermédios calculados

As tabelas seguintes apresentam uma compilação de todos os parâmetros calculados e utilizados no decorrer da presente dissertação.

Para obtenção dos valores da força gel de cada amostra analisada, era necessário o pré conhecimento do valor o peso do aparelho sendo este de 247,60 gramas. A subtração encontrada por esta parcela em relação à mesma com o peso da água perfurada no gel, dar-nos-ia o valor da força gel da respetiva amostra.

Tabela 7-1 Resultados dos ensaios de Força-Gel obtidos

Amostra /Ensaio	AGAR			Força gel medida (g/cm ²)	Força gel medida sem a proveta (g)	Média Força gel (g/cm ²)
	Data da amostra	Ensaio	Amostra pesada (g) para 50ml			
Comercial	-	1,00	0,75	786,90	552,23	475,80
		2,00	0,76	<aparelho	0,00	
		3,00	0,76	801,58	566,91	
		4,00	0,76	811,72	577,05	
		5,00	0,75	796,54	561,87	
		6,00	0,78	504,95	270,28	
		7,00	0,76	561,14	326,47	
1 e 2	12/02/2014	1,00	0,75	< aparelho	0,00	274,06
		2,00	0,75	503,36	268,69	
		3,00	0,75	514,10	279,43	
3	20/02/2014	1,00	0,75	447,12	212,45	232,49
		2,00	0,75	475,18	240,51	
		3,00	0,75	479,19	244,52	
4	18/03/2014	1,00	0,76	< aparelho	0,00	0,00
		2,00	0,76	< aparelho	0,00	
		3,00	0,75	< aparelho	0,00	
5	25/03/2014	1,00	0,75	497,28	262,61	339,30
		2,00	0,76	663,88	429,21	
		3,00	0,75	560,75	326,08	
		4,00	0,75	678,69	444,02	
		5,00	0,75	714,12	479,45	
6	27/03/2014	1,00	0,76	451,89	217,22	216,22
		2,00	0,76	438,91	204,24	
		3,00	0,75	461,87	227,20	
		4,00	0,75	558,56	323,89	
		5,00	0,75	485,52	250,85	
7	31/03/2014	1,00	0,75	498,23	263,56	240,40
		2,00	0,75	491,78	257,11	
		3,00	0,75	435,21	200,54	
		4,00	0,78	549,79	315,12	

		5,00	0,74	464,76	230,09	
8	09/04/2014	1,00	0,75	476,93	242,26	236,65
		2,00	0,75	447,48	212,81	
		3,00	0,75	489,54	254,87	
9	10/04/2014	1,00	0,75	452,34	217,67	244,88
		2,00	0,76	497,26	262,59	
		3,00	0,76	489,05	254,38	
10	11/04/2014	1,00	0,75	450,18	215,51	207,95
		2,00	0,75	432,93	198,26	
		3,00	0,75	444,76	210,09	
8	09/04/2014	1,00	0,75	505,88	271,21	265,05
		2,00	0,75	487,74	253,07	
		3,00	0,75	505,54	270,87	
9	10/04/2014	1,00	0,75	509,33	274,66	274,66
		2,00	-	-	-	
		3,00	-	-	-	
10	11/04/2014	1,00	0,75	458,85	224,18	251,53
		2,00	0,74	513,54	278,87	
		3,00	-	-	-	
11	14/04/2014	1ª Ext	0,76	582,30	347,63	347,63
12	14/04/2014	3ªExt	0,76	447,77	213,10	213,10
13	24/04/2014	Ext 1	0,75	466,30	231,63	231,63
14		ext2	0,75	480,08	245,41	245,41
15		ext 3	0,76	449,03	214,36	214,36
16		ext4	0,76	457,26	222,59	222,59
17		Ext 5 1/3	0,75	509,10	274,43	287,31
		Ext 5 2/3	0,76	535,16	300,49	
		Ext 5 3/3	0,75	521,69	287,02	
18		Ext 5 1ª LAV 1/3	0,76	534,56	299,89	268,67
		Ext 5 1ª LAV 2/3	0,76	467,91	233,24	
		Ext 5 1ª LAV 3/3	0,75	507,55	272,88	
		Ext5 2ª LAV 1/3	0,76	546,48	311,81	299,19
		Ext5 2ª LAV 2/3	0,75	493,12	258,45	
		Ext5 2ª LAV 3/3	0,75	561,97	327,30	
19	20/10/2014	ext opt 1	0,76	674,23	439,56	401,55
0,76			598,21	363,54		
20		ext opt 2	0,76	574,23	339,56	302,05
0,75			499,21	264,54		
21	15/01/2015	ext1 sem pré tratamento	0,40	< aparelho	-	
22		ext2 sem pré tratamento	0,38	< aparelho	-	
23		ext3 sem pré tratamento	0,35	300,25	65,58	65,58
24	19/01/2015	ext opt 3/1	0,74	555,21	320,54	323,91

Capítulo 7

25		ext opt 3/2	0,76	524,23	289,56	402,21
		ext opt 3/3	0,75	596,30	361,63	
		ext opt 4/1	0,72	632,12	397,45	
		ext opt 4/2	0,77	820,20	585,53	
		ext opt 4/3	0,75	458,32	223,65	
26	22/01/2015	ext opt 5/1	0,76	652,32	417,65	392,94
ext opt 5/2		0,71	458,20	223,53		
ext opt 5/3		0,77	772,30	537,63		
27		ext opt 6/1	0,76	800,21	565,54	496,55
ext opt 6/2		0,78	652,23	417,56		
ext opt 6/3	0,75	741,23	506,56			
28	27/01/2015	ext opt 7/1	0,76	895,32	660,65	540,51
ext opt 7/2		0,75	660,00	425,33		
ext opt 7/3		0,74	770,23	535,56		
29		ext opt 8/1	0,76	652,34	417,67	386,77
ext opt 8/2		0,79	559,52	324,85		
ext opt 8/3	0,72	652,45	417,78			
30	03/02/2015	ext opt 9/1	0,75	777,25	542,58	396,03
ext opt 9/2		0,75	614,52	379,85		
ext opt 9/3		0,74	500,32	265,65		
31		ext opt 10/1	0,75	664,31	429,64	302,52
ext opt 10/2		0,80	625,80	391,13		
ext opt 10/3	0,75	321,45	86,78			
32	11/02/2015	ext opt 11/1	0,75	732,12	497,45	508,66
ext opt 11/2		0,75	785,65	550,98		
ext opt 11/3		0,77	712,23	477,56		
33		ext opt 12/1	0,78	554,36	319,69	326,28
ext opt 12/2		0,79	569,14	334,47		
ext opt 12/3		0,79	559,35	324,68		
34		ext opt 13/1	0,75	558,13	323,46	381,63
ext opt 13/2		0,76	624,13	389,46		
ext opt 13/3		0,75	666,66	431,99		
35	24/02/2015	ext opt 14/1	0,79	412,67	178,00	422,70
ext opt 14/2		0,75	678,23	443,56		
ext opt 14/3		0,72	881,20	646,53		
36		ext opt 15/1	0,75	755,99	521,32	396,76
ext opt 15/2		0,75	568,79	334,12		
ext opt 15/3		0,75	569,52	334,85		
37		ext opt 16/1	0,75	365,25	130,58	284,95
ext opt 16/2		0,75	652,32	417,65		
ext opt 16/3		0,76	541,28	306,61		
38	26/02/2015	ext opt 17/1	0,76	555,21	320,54	281,99
ext opt 17/2		0,75	652,23	417,56		
ext opt 17/3		0,73	342,55	107,88		
39		ext opt 18/1	0,77	741,23	506,56	403,83
ext opt 18/2		0,79	512,23	277,56		

		ext opt 18/3	0,74	662,03	427,36	
40		ext opt 19/1	0,75	433,00	198,33	200,85
		ext opt 19/2	0,79	552,12	317,45	
		ext opt 19/3	0,75	321,45	86,78	
		ext opt 20/1	0,75	520,32	285,65	
41		ext opt 20/2	0,75	561,00	326,33	343,84
		ext opt 20/3	0,75	654,20	419,53	

De seguida são apresentadas as tabelas referentes à quantificação de 3,6-Anidrogactose e de Sulfato.

Tabela 7-2 Valores para o cálculo da 3,6-Anidrogactose

Ensaio	m agar (mg)	m agar (mg)	m agar (mg)	Absorvância			% 3,6 AG 1	% 3,6 AG 2	% 3,6 AG 3	Média 3,6	Desv pad.
	11,10	10,60	11,40	0,42	0,42	0,42	44,77	47,12	43,59	45,16	1,80
1 e 2	10,10	11,10	11,90	0,29	0,29	0,29	32,45	29,30	27,75	29,83	2,39
3	11,20	10,10	12,00	0,29	0,29	0,22	29,71	32,95	20,26	27,64	6,59
4	10,10	10,10	13,20	0,30	0,25	0,25	34,08	27,83	21,39	27,76	6,34
5	10,10	10,20	11,30	0,11	0,11	0,11	10,08	9,98	9,01	9,69	0,59
6	10,70	10,90	12,00	0,30	0,29	0,29	31,93	30,65	27,94	30,17	2,03
7	10,20	11,90	12,60	0,31	0,31	0,31	34,86	29,56	28,12	30,84	3,55
8	11,90	10,60	11,90	0,35	0,35	0,34	33,70	37,95	33,38	35,01	2,55
8 lavage m	10,40	11,10	14,00	0,35	0,22	0,25	38,56	21,91	19,89	26,79	10,24
9	10,60	10,10	14,30	0,28	0,29	0,28	30,44	32,70	22,48	28,54	5,37
9 lavage m	11,10	10,10	12,40	0,28	0,27	0,28	28,28	30,45	25,62	28,11	2,42
10	10,10	10,20	12,50	0,27	0,27	0,29	30,45	30,15	26,22	28,94	2,36
10 lavage m	10,10	10,30	12,00	0,28	0,27	0,28	31,33	29,98	26,16	29,15	2,68
11	10,20	10,50	12,30	0,32	0,31	0,33	36,22	33,98	31,06	33,75	2,59
11 lavage m	10,30	10,40	10,20	0,20	0,20	0,20	21,28	21,07	21,49	21,28	0,21
12	10,50	10,10	10,30	0,41	0,41	0,40	46,00	47,83	45,55	46,46	1,20
12 lavage m	10,40	11,20	10,80	0,30	0,31	0,30	32,97	31,86	31,98	32,27	0,61
13	11,10	10,10	14,00	0,40	0,40	0,40	42,61	46,70	33,78	41,03	6,60
13 lavage m	11,90	10,10	11,90	0,37	0,35	0,37	36,77	40,58	35,82	37,72	2,52
13 tab secage m	12,00	10,70	10,10	0,37	0,34	0,35	35,83	36,65	40,08	37,52	2,25
14	13,00	10,20	10,10	0,35	0,30	0,35	31,04	33,74	39,95	34,91	4,57
14 lavage m	12,60	11,90	10,70	0,27	0,27	0,26	24,11	25,21	27,56	25,63	1,77
15	13,60	10,40	10,20	0,38	0,38	0,39	32,36	43,17	44,76	40,10	6,75

Capítulo 7

15 lavagem	10,00	10,60	11,90	0,25	0,22	0,28	27,47	22,94	26,80	25,74	2,45
16	14,30	11,10	10,40	0,34	0,32	0,31	27,51	33,05	34,31	31,62	3,62
16 lavagem	12,00	10,10	10,60	0,31	0,31	0,31	29,94	35,58	33,90	33,14	2,89
17	10,20	10,10	11,10	0,30	0,31	0,31	33,87	34,70	32,03	33,53	1,37
17 lavagem	10,60	10,20	12,00	0,30	0,30	0,30	32,23	33,49	28,68	31,47	2,50
18	10,20	10,90	10,20	0,36	0,36	0,36	41,66	38,99	41,66	40,77	1,54
18 1ª lavagem	10,40	11,90	10,60	0,21	0,21	0,21	22,29	19,48	21,87	21,21	1,52
18 2ª lavagem	11,60	10,60	10,20	0,27	0,27	0,27	26,19	28,54	29,90	28,21	1,88
19	10,50	11,10	10,40	0,49	0,49	0,49	55,26	52,62	55,79	54,56	1,70
20	10,40	10,10	11,60	0,47	0,46	0,47	53,61	54,33	48,06	52,00	3,43
21	10,50	10,10	10,50	0,10	0,12	0,14	8,61	12,08	14,02	11,57	2,74
22	12,10	10,20	10,40	0,10	0,08	0,10	7,47	6,88	9,18	7,84	1,19
23	10,90	10,30	10,50	0,12	0,12	0,12	11,07	11,84	11,50	11,47	0,38
24	11,00	10,50	12,10	0,37	0,37	0,35	38,75	40,83	34,08	37,89	3,46
25	11,20	10,40	10,90	0,41	0,41	0,42	43,13	46,45	45,82	45,13	1,76
26	10,90	10,50	11,00	0,40	0,41	0,42	43,27	46,24	45,18	44,90	1,50
27	10,10	12,10	11,20	0,33	0,33	0,33	37,20	31,16	33,55	33,97	3,04
28	10,70	10,20	10,40	0,46	0,43	0,45	51,28	50,08	51,55	50,97	0,78
29	10,30	11,00	10,10	0,31	0,31	0,31	34,15	32,67	35,33	34,05	1,33
30	10,20	11,20	10,10	0,36	0,38	0,33	41,17	39,75	37,70	39,54	1,74
31	10,60	10,90	10,30	0,31	0,31	0,31	33,66	32,73	34,64	33,68	0,95
32	10,40	10,10	10,20	0,38	0,39	0,30	43,05	44,83	33,74	40,54	5,95
33	10,30	10,10	10,40	0,34	0,35	0,35	38,56	40,58	38,68	39,27	1,13
34	10,40	10,30	10,30	0,32	0,32	0,32	34,91	35,25	35,25	35,14	0,20
35	10,10	10,90	10,90	0,37	0,36	0,37	42,20	38,99	39,10	40,10	1,82
36	11,60	10,60	10,70	0,40	0,41	0,39	40,44	44,97	42,90	42,77	2,27
37	11,40	10,40	11,60	0,35	0,36	0,35	36,06	40,26	35,55	37,29	2,58
38	11,90	10,30	11,40	0,36	0,36	0,35	34,86	40,77	36,17	37,27	3,10
39	12,00	10,40	11,90	0,39	0,38	0,35	37,73	42,80	34,44	38,32	4,21
40	13,20	10,70	12,00	0,35	0,36	0,35	31,05	39,24	34,15	34,81	4,14
41	10,10	11,60	11,90	0,35	0,36	0,36	40,58	36,09	34,97	37,21	2,97

Tabela 7-3 Valores para o cálculo do teor de Sulfato do ágar.

~9	Data amostra	Absorvância			Média	Concentração (w/w) %			Média sulf.	desv
14,3	Comercial	0,021	0,012	0,014	0,016	0,37%	0,21%	0,24%	0,27%	0,09%
12,9	12/fev	0,071	0,070	0,068	0,070	1,44%	1,42%	1,38%	1,41%	0,03%
14,4	20/fev	0,161	0,170	0,167	0,166	2,94%	3,10%	3,05%	3,03%	0,08%
12	18/mar	0,106	0,105	0,104	0,105	2,32%	2,29%	2,27%	2,29%	0,02%
12,4	31/mar	0,094	0,092	0,092	0,093	1,99%	1,94%	1,94%	1,96%	0,02%

11,5		0,093	0,093	0,092	0,093	2,12%	2,12%	2,09%	2,11%	0,01%
11,7		0,065	0,064	0,064	0,064	1,45%	1,43%	1,43%	1,43%	0,01%
12,4	11/abr	0,081	0,082	0,082	0,082	1,71%	1,73%	1,73%	1,72%	0,01%
10,7		0,048	0,047	0,048	0,048	1,17%	1,14%	1,17%	1,16%	0,01%
11,8		0,047	0,046	0,046	0,046	1,03%	1,01%	1,01%	1,02%	0,01%
12,5		0,095	0,094	0,094	0,094	1,99%	1,97%	1,97%	1,98%	0,01%
12,9		0,066	0,065	0,066	0,066	1,33%	1,31%	1,33%	1,33%	0,01%
13,1		0,047	0,048	0,046	0,047	0,93%	0,95%	0,91%	0,93%	0,02%
11,2	14/abr	0,051	0,050	0,049	0,050	1,18%	1,16%	1,14%	1,16%	0,02%
12,5		0,054	0,054	0,054	0,054	1,12%	1,12%	1,12%	1,12%	0,00%
12,8		0,051	0,050	0,050	0,050	1,04%	1,02%	1,02%	1,02%	0,01%
12,8		0,038	0,038	0,037	0,038	0,77%	0,77%	0,75%	0,76%	0,01%
13		0,059	0,059	0,059	0,059	1,18%	1,18%	1,18%	1,18%	0,00%
13,2		0,085	0,091	0,089	0,088	1,68%	1,80%	1,76%	1,75%	0,06%
10,8		0,039	0,038	0,037	0,038	0,93%	0,91%	0,89%	0,91%	0,02%
14,2	24/abr	0,121	0,118	0,118	0,119	2,24%	2,18%	2,18%	2,20%	0,03%
12,8		0,047	0,047	0,047	0,047	0,95%	0,95%	0,95%	0,95%	0,00%
11,9		0,099	0,098	0,097	0,098	2,18%	2,16%	2,14%	2,16%	0,02%
12,8		0,048	0,048	0,043	0,046	0,97%	0,97%	0,87%	0,94%	0,06%
11,9		0,060	0,059	0,059	0,059	1,31%	1,29%	1,29%	1,30%	0,01%
11,5		0,041	0,040	0,039	0,040	0,92%	0,90%	0,88%	0,90%	0,02%
12,3		0,040	0,040	0,040	0,040	0,84%	0,84%	0,84%	0,84%	0,00%
12,4		0,033	0,038	0,036	0,036	0,69%	0,79%	0,75%	0,74%	0,05%
14,9		0,102	0,103	0,099	0,101	1,79%	1,81%	1,74%	1,78%	0,04%
14,8		0,073	0,072	0,073	0,073	1,29%	1,27%	1,29%	1,28%	0,01%
14,6		0,066	0,064	0,063	0,064	1,18%	1,14%	1,13%	1,15%	0,03%
13,7	20/out	0,045	0,040	0,025	0,037	0,85%	0,76%	0,47%	0,69%	0,20%
14,3		0,047	0,036	0,023	0,035	0,85%	0,65%	0,41%	0,64%	0,22%
12,5	15/jan	0,112	0,099	0,103	0,105	2,35%	2,07%	2,16%	2,19%	0,14%
12,4		0,125	0,095	0,123	0,114	2,65%	2,01%	2,60%	2,42%	0,36%
12,6		0,101	0,101	0,099	0,100	2,10%	2,10%	2,06%	2,09%	0,02%
11,9	19/jan	0,04	0,047	0,035	0,041	0,87%	1,03%	0,76%	0,88%	0,13%
12,1		0,032	0,033	0,033	0,033	0,68%	0,70%	0,70%	0,70%	0,01%
13,2	22/jan	0,051	0,048	0,041	0,047	1,00%	0,94%	0,80%	0,92%	0,10%
13,2		0,032	0,042	0,033	0,036	0,62%	0,82%	0,64%	0,70%	0,11%
12,3	27/jan	0,026	0,021	0,021	0,023	0,54%	0,43%	0,43%	0,47%	0,06%
13,2		0,040	0,038	0,038	0,039	0,78%	0,74%	0,74%	0,76%	0,02%
14,2	03/fev	0,032	0,033	0,033	0,033	0,58%	0,60%	0,60%	0,59%	0,01%
12		0,042	0,045	0,042	0,043	0,91%	0,97%	0,91%	0,93%	0,04%

Capítulo 7

12,6	11/fev	0,021	0,021	0,021	0,021	0,42%	0,42%	0,42%	0,42%	0,00%
11,9		0,032	0,036	0,035	0,034	0,69%	0,78%	0,76%	0,74%	0,05%
11,9		0,034	0,034	0,034	0,034	0,74%	0,74%	0,74%	0,74%	0,00%
13,5	24/fev	0,038	0,039	0,039	0,039	0,73%	0,75%	0,75%	0,74%	0,01%
11,8		0,040	0,040	0,041	0,040	0,88%	0,88%	0,90%	0,88%	0,01%
12,5		0,051	0,040	0,048	0,046	1,06%	0,83%	1,00%	0,96%	0,12%
12,4	26/fev	0,032	0,034	0,036	0,034	0,66%	0,71%	0,75%	0,71%	0,04%
12,7		0,035	0,032	0,034	0,034	0,71%	0,65%	0,69%	0,68%	0,03%
12,6		0,031	0,034	0,031	0,032	0,63%	0,70%	0,63%	0,65%	0,04%
13,7		0,051	0,050	0,049	0,050	0,97%	0,95%	0,93%	0,95%	0,02%

Deste modo, conseguiu-se então obter a tabela final onde todos os resultados foram compilados.

Ensaio	Massa de algas inicial	Concentração PT	Tempo PT	Tempo de extração	Massa de agar	Rendimento (%)	Força gel g/cm ²	3,6-AG (%)	Sulfatos (%)
1	22,46	0	0	2,50	0,61	2,73%	< aparelho	11,57	2,20%
2	21,53	0	0	2,50	0,43	1,98%	< aparelho	7,84	2,65%
3	24,93	0	0	2,50	0,51	2,06%	65,58	11,47	2,14%
4	240,98	6	1	3,00	15,95	6,62%	232,4933	29,83	3,10%
5	263,57	6	4	2,50	17,96	6,81%	< aparelho	27,64	2,34%
6	169,53	6	6	2,50	15,69	9,25%	339,3	27,76	1,98%
7	167,38	6	8	2,00	23,23	13,88%	216,22	9,69	2,16%
8	166,81	6	12	2,00	34,01	20,39%	240,4033	30,17	1,46%
9	169,71	6	8	2,50	13,58	11,71%	236,6467	30,84	1,77%
10					6,29		265,05	35,01	1,20%
11	21,66	6	5	3,00	1,25	8,23%	347,63	26,79	1,20%
12					0,53		não havia suf.	28,54	1,16%
13	20,30	6	5	3,00	0,51	4,95%	não havia suf.	28,11	1,05%
14					0,49		não havia suf.	28,94	0,80%
15	22,85	6	5	3,00	0,53	9,76%	não havia suf.	29,15	1,21%
16					1,35		213,10	33,75	1,80%
17					0,35		não havia suf.	21,28	0,94%
18	22,86	6	9	3,00	2,58	14,68%	231,63	46,46	2,22%
19					0,77		não havia suf.	32,27	0,98%
20	24,00	6	9	3,00	2,80	15,36%	245,41	41,03	2,20%
21					0,89		não havia suf.	37,72	1,00%

22	22,36	6	9	3,00	2,45	14,55%	214,36	37,52	1,33%
23					0,80		não havia suf.	34,91	0,93%
24	22,22	6	9	3,00	0,69	12,45%	não havia suf.	25,63	0,87%
25					2,07		222,59	40,10	0,78%
26	176,2 5	6	9	3,50	11,27	11,20%	287,31	25,74	1,83%
27					5,00		268,67	31,62	1,32%
28					3,47		299,19	33,14	1,17%
29	28,75	7	5	2,50	10,55	36,68%	401,55	56,53	0,78%
30	23,03	7	4	2,50	6,88	29,86%	302,05	54,97	0,68%
31	168,3 5	10	8	2,50	7,38	5,73%	244,88	28,54	1,04%
32					2,26		274,66	28,12	2,01%
33	389,6 9	14	8	2,50	15,18	3,83%	274,06	34,64	1,45%
34	168,1 8	14	8	2,5	8,475 5	7,15%	207,9533	28,94	1,33%
35					3,548 4		251,525	29,16	0,93%
36	25,21 45	6	6	2,5	7,851 2	31,14%	323,91	37,89	0,90%
37	23,21 45	6	6	2,5	8,125 4	35,00%	402,21	45,13	0,73%
38	28,25 78	6	6	2,5	10,2	36,10%	392,94	44,90	0,97%
39	29,21 45	6	6	2,5	8,514 2	29,14%	496,5533	33,97	0,67%
40	24,23 65	6	6	2,5	7,989 8	32,97%	540,51	50,97	0,46%
41	25,00 01	6	6	2,5	8,321 4	33,29%	386,7667	34,05	0,77%
42	25,20 35	6	6	2,5	11,20 1	44,44%	396,03	39,54	0,62%
43	26,00 14	6	6	2,5	10,21 45	39,28%	302,5167	33,68	0,94%
44	25,45 28	6	6	2,5	9,125 8	35,85%	508,66	40,54	0,45%
45	26,25 47	6	6	2,5	8,787 5	33,47%	326,28	39,27	0,79%
46	26,89 99	6	6	2,5	9,568 4	35,57%	381,63	35,14	0,77%
47	27,25 4	6	6	2,5	9,214 5	33,81%	422,6967	40,10	0,77%
48	25,35 41	6	6	2,5	7,524 1	29,68%	396,76	42,77	0,91%
49	26,21 45	6	6	2,5	12,32	47,00%	284,9467	37,29	1,03%
50	24,31 25	6	6	2,5	10,26 54	42,22%	281,99	37,27	0,74%
51	25,00 21	6	6	2,5	9,587 4	38,35%	403,8267	38,32	0,72%
52	25,02 15	6	6	2,5	11,65 47	46,58%	200,85	34,81	0,66%
53	25,01 35	6	6	2,5	8,325 4	33,28%	343,8367	37,21	0,98%

7.2. Preparação da solução de cloreto de bário em gelatina

Este reagente foi preparado por várias etapas. Inicialmente, dissolveu-se 0,5g de gelatina (Merck Gelatine) em 100 mL de água quente. Deixou-se posteriormente arrefecer esta solução e guardou-se no frigorífico durante cerca de 24 horas até ser verificada a presença

de um fluido semi-gelatinoso com uma opacidade esbranquiçada. Depois, acrescentou-se a esta mesma solução 0,5g de cloreto de bário sendo esta solução homogeneizada recorrendo a uma placa magnética e ao respetivo magneto. O reagente foi conservado até à leitura das respetivas absorvâncias sendo que, a validade do mesmo seria cerca de uma semana (Santos, 2011).

7.3. Diagrama de extremos e quartis

Para a obtenção dos diagramas de extremos e quartis, foram realizadas as seguintes tabelas:

Tabela 7-4 Organização dos resultados das extrações ótimas para a realização dos diagramas de extremo e quartis

Ensaio	Rendimento (%)	Força gel (g/cm ²)	3,6-AG (%)	Sulfato (%)
1	31,140	323,910	37,887	0,885
2	35,000	402,210	45,132	0,696
3	36,100	392,940	44,898	0,916
4	29,140	496,550	33,968	0,698
5	32,970	540,510	50,968	0,468
6	33,290	386,770	34,047	0,758
7	44,440	396,030	39,539	0,593
8	39,280	302,520	33,677	0,929
9	35,850	508,660	40,538	0,423
10	33,470	326,280	39,272	0,744
11	35,570	381,630	35,140	0,737
12	33,810	422,700	40,097	0,741
13	29,680	396,760	42,774	0,885
14	47,000	284,950	37,287	0,962
15	42,220	281,990	37,267	0,707
16	38,350	403,830	38,324	0,683
17	46,580	200,850	34,814	0,654
18	33,280	343,840	37,212	0,948

Tabela 7-5 Valores necessários à representação dos diagramas de extremos e quartis respetivos aos valores da Tabela 7-4

BI	22,984	183,5850	26,0008	0,3503
1ºquartil-min	4,063	117,7125	1,3815	0,2528
Mínimo	29,140	200,8500	33,6770	0,4230
1º Quartil	33,203	318,5625	35,0585	0,6758
Mediana	35,285	389,8550	38,1055	0,7390
3º Quartil	40,015	408,5475	41,0970	0,8928
Max-3ºquartil	6,985	131,9625	4,0350	0,0692
Máximo	47,000	540,5100	45,1320	0,9620
BS	50,234	543,5250	50,1548	1,2183
1,5 dQ	10,219	134,9775	9,0578	0,3255